

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

老化對人類眼輪匝肌組織型態特徵之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-299-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：湯月碧

計畫參與人員：鄭乃禎

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

一、中文摘要：

眼輪匝肌 (Orbicularis oculi muscle) 在眼睛四周的解剖構造中佔了關鍵地位，並在這區域的老化過程中扮演了重要角色。眼睛四周的年輕化 (Peri-orbital rejuvenation) 一直是整形外科領域中極有興趣的課題，我們相信藉由了解眼輪匝肌老化相關的變化，將對改善現有的年輕化技術或開發新的年輕化方法建立深入研究的基礎。然而文獻中並沒有任何相關的研究報告，因為眼輪匝肌的採樣不僅困難且有傷及眼球的危險。

事實上在眼皮整型手術中所切除的軟組織中即含有小部分的眼輪匝肌，所以我們以在國立台灣大學醫學院附設醫院接受上眼皮整型手術 (Upper blepharoplasty) 的病人為對象，取得不同年紀病人的眼輪匝肌樣本。

此研究的目的是以組織型態學的方法評估人類眼輪匝肌因老化產生的各型肌肉纖維組成變化。眼輪匝肌的肌肉樣本自手術中取得後立刻在液態氮中做冷凍包埋，接著送病理科切片，對肌纖維中的腺三磷酸酵素 (ATPase) 作特殊染色。我們在顯微鏡下觀察這些切片並選擇具橫斷切面的適當區域照相，相片掃描入電腦後以影像處理軟體分析即可得到該區域中各肌肉纖維的數目及其所佔的面積，並可進一步算出不同肌肉纖維間的比例及其平均直徑。

將接受上眼皮整型手術的病人依年齡分組，每組中計算所得的各型肌肉纖維的數目，其所佔的面積，即可相互比較，進而推估人類眼輪匝肌因老化產生的相關變化。

關鍵詞：老化，眼輪匝肌，上眼皮整型術，肌球重鏈蛋白

二、英文摘要:

Orbicularis oculi muscle is a key structure in the peri-orbital anatomy and is responsible for the major changes of aging in this area. Peri-orbital rejuvenation has been an issue of great interest in plastic surgery. We believe that understanding the age-related changes in orbicularis oculi muscle is important for improving the current rejuvenation techniques or developing the new ones. Nevertheless, a study focusing on this topic has never been performed before, simply because it is difficult and dangerous to perform needle biopsy on orbicularis oculi muscle.

We recruited patients who received upper blepharoplasty in National Taiwan University Hospital as our subjects. Taking advantage of the discarded soft tissue in the blepharoplasty surgery, samples of orbicularis oculi muscle can be easily obtained from patients of various ages.

In our study, the muscle specimens are mounted for transverse section and frozen in liquid propane chilled with liquid nitrogen. Muscle fiber types can be classified

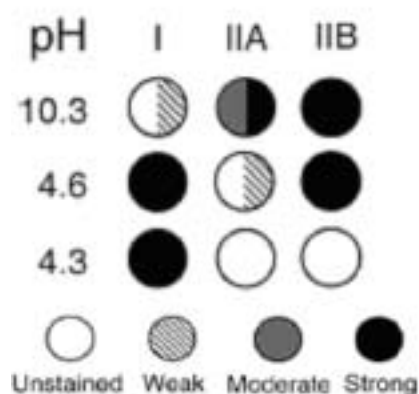
with myofibrillar ATPase staining. The ATPase-stained muscle sections were processed as a videoprint. Suitable areas of each section containing transversely cut muscle fibers were photographed. The image file was processed with an image analysis system. The number of each fiber per photographed area and the cross sectional area of each fiber can be determined.

By dividing the subjects who had their orbicularis oculi muscle sampled during upper blepharoplasty operation into age groups, the different muscle type compositions can be compared among the different groups. Therefore, the age-related changes in fiber type compositions fiber cross section areas of human orbicularis oculi muscle can be concluded.

Key words : Aging, Orbicularis oculi, Upper blepharoplasty, Myosin heavy chain

三、研究背景:

人體的骨骼肌由眾多肌肉纖維所構成，這些肌肉纖維在一般組織學染色下並無不同，然而隨組織化學染色方法 (histochemical staining) 的發展，許多肌肉纖維的分類方法也被提出。其中最被廣泛應用的是肌球蛋白腺三磷酸酵素 (myosin ATPase) 組織化學染色，其原理為不同肌肉纖維的肌球蛋白磷酸水解酶在不同酸鹼值下的活性不同(1, 2)。經 pH 10.3, pH 4.6, pH 4.3 三種不同酸鹼值溶液中分別預浸後，在 pH 9.4 的溶液中作特殊染色，不同的肌肉纖維會染上不同的深淺顏色。藉由比對三種不同不同酸鹼值下的染色結果，即可將肌肉纖維分為第 I 型及第 II 型，而第 II 型又可進一步分為 IIA 及 IIB 型。第 I 型肌肉纖維在酸性溶液中 (pH 4.3 或 4.6) 會深染，而在鹼性溶液中 (pH 10.3) 是淡染。第 II 型肌肉纖維在 pH 4.3 溶液中不會被染色，而在 pH 10.3 溶液中是深染，但在 pH 4.6 溶液中，第 IIA 型肌肉纖維不會被染色或淡染，而第 IIB 型肌肉纖維是深染(圖一)。第 I 型肌肉纖維常被稱為慢纖維 (slow-twitch fiber)，因其收縮速度較慢，而第 II 型肌肉纖維常被稱為快纖維 (fast-twitch fiber)(3)。



圖一. 人體骨骼肌的肌肉纖維在三種不同不同酸鹼值下預浸後，其肌球蛋白磷酸水解酶 (myosin ATPase) 組織化學染色的染色結果。

老化對人體骨骼肌的影響是多年來的一個熱門研究課題，應用肌球蛋白腺三磷酸酵素組織化學染色研究各型肌肉纖維組成及其截面積，再比較不同年紀實驗對象間之差異成為一常用的研究方法。大部份的研究以四肢的肌肉或臉部的塊肌肉為研究材料，因為這些樣本可安全地以細針採樣自健康的志願者身上取得。Coggan 等人(4)及 Essen-Gustavsson 等人(5)的研究顯示 Gastrocnemius 及 Vastus lateralis 肌肉纖維的組成比例不因老化而改變，但個別的面積會減少，尤其是第 II 型肌纖維表現出統計上有意義的截面積減少情形。Monemi 等人(6)同時比較 Masseter 及 Biceps brachii 肌肉纖維因老化而產生的變化，發現老年人臉部 Masseter 的第 I 型肌肉纖維所佔比例顯著減少，而第 II 型肌肉纖維所佔比例顯著增加。相反的，Biceps 肌肉纖維的組成比例不因老化而改變，但是其第 IIB 型肌纖維表現出統計上有意義的截面積減少。Kirkeby 等人(7)以類似的方法比較 Masseter 及 Vastus lateralis 肌肉纖維因老化而產生的變化，也得到老化對身體上不同部位的骨骼肌會產生不同的影響的研究結論。

年輕化 (Rejuvenation) 一直是整形外科領域中研究的重點之一。臉部的老化以眼睛四周最先開始也最明顯，而眼輪匝肌在眼睛四周的解剖構造中佔了關鍵地位，並深切影響了這區域的老化過程。臉部的年輕化尤其是許多人藉由手術或藥物所希望達到的目標，例如近年來以肉毒桿菌 (botulinum toxin) 注射魚尾紋下之眼輪匝肌，藉麻痺眼輪匝肌以消除皺紋的非手術美容方法十分風行。故了解眼輪匝肌的老化過程，進而改善現有的眼睛四周回春技術，或開發新的回春方法誠為一重要課題。

人類的眼輪匝肌位於眼睛四周，分為 pretarsal, preseptal 及 orbital 三部分(圖三)。Pretarsal 及 preseptal 部分眼輪匝肌的作用是一般日常生活眨眼的動作，而 orbital 部分是用眼閉時才會用到的肌肉。眼輪匝肌的肌肉纖維主要由第 II 型肌纖維所構成，依不同研究者的報告，約佔 85 至 89 % (20-22)。第 II 型肌肉纖維為適合快速運動的肌纖維，以第 II 型肌纖維為主的肌肉結構正適合人類清醒時每分鐘眨眼 12-13 次的運動需求(20)。Lander 等人(23) 並報告在 pretarsal 及 preseptal 部分的眼輪匝肌肌纖維較短，相互重疊且長度參差不齊。因為眼輪匝肌的細針採樣不僅困難且有傷及眼球的危險，這些研究的樣本主要來自捐贈的遺體，其數量有限，故沒有人研究過眼輪匝肌因老化所產生的變化。

臨床上，我們觀察到眼輪匝肌隨年齡增長會拉長而變鬆弛，但對其因老化產生的分子生物學及組織型態學變化卻所知甚少。由前人的研究我們得知老化對身體上不同部位的骨骼肌會產生不同的影響，因此要了解眼輪匝肌的老化，我們必須直接研究其本身的變化。事實上在眼皮整形手術中所切除的軟組織中即含有小部分的眼輪匝肌。年輕的病人希望做出美觀的雙眼皮，老年人則因鬆垂的上眼皮遮蔽視線而希望動手術，所以我們可順利且安全地取得不同年紀病人的眼輪匝肌樣本來進行研究。

四. 研究目的：

以不同年紀病人的眼輪匝肌樣本為研究材料，利用肌纖維組織化學染色方法及電腦影像分析，我們可研究眼輪匝肌因老化產生的組織型態學變化。

五. 研究方法：

- A. 本計畫以在國立台灣大學醫學院附設醫院接受上眼皮整型手術，並切除部份上眼皮的病人為對象，取得切除組織中的眼輪匝肌為樣本。
- B. 參與本研究的病人純粹為美觀或鬆垂的上眼皮遮蔽視線而希望動手術，排除有重大疾病或內分泌疾病者。
- C. 本計畫經國立台灣大學醫學院附設醫院倫理委員會審查通過，納入計畫的病人都同意參與本研究。
- D. 實驗步驟如下：
 1. 將上眼皮整型手術中所切除組織中的眼輪匝肌採樣，立刻在液態氮 -150°C 中做冷凍包埋。
 2. 送病理科製作組織切片，經 pH 10.3, pH 4.6, pH 4.3 三種不同酸鹼值溶液中分別預浸後，在 pH 9.4 的溶液中對肌纖維中的 ATPase 作組織化學染色。
 3. 在顯微鏡下觀察這些切片，並選擇具肌纖維橫斷切面的適當區域照相。
 4. 相片掃描入電腦後以影像處理軟體 Image-Pro Plus image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) 分析，在適當放大倍率下分辨不同亞型的肌纖維並將其邊緣圈起，軟體可計算出其所佔的面積，接近圓形的程度及平均直徑，並可得到該區域中各肌肉纖維的數目，進一步算出不同肌肉纖維間的比例。
 5. 將接受上眼皮整型手術的病人依年齡分組，我們先計算各組中的組織型態學變數平均值及標準差，再以 ANOVA 試驗比較各組間的平均值是否有統計學上的顯著差異。

六. 研究結果與討論

本計畫收集 53 位實驗對象的眼輪匝肌樣本，平均年齡 55.1 歲，含男性 18 人，女性 35 人。共有 29 歲以下的 9 人，70 歲以上的 18 人，30 至 69 歲之間的 26 人。眼輪匝肌的組織型態學以第 II 型肌肉纖維為主要結構，第 I 型肌肉纖維只約佔 10%。

每個肌肉纖維是由許多稱為肌小節(sarcomere)的功能性單位所組成，而每個肌小節是由 myosin 及 actin 所組成，這兩者之間的相互作用使骨骼肌能夠收縮。肌球蛋白是由 2 個重鏈蛋白 (myosin heavy chain) 及 6 個輕鏈蛋白 (myosin light chain) 所構成。肌球重鏈蛋白的分子量遠大於輕鏈蛋白，因此是構成肌纖維的主

要蛋白質，學者並發現組織化學染色下不同型肌纖維中含有不同亞型的肌球重鏈蛋白，此因重鏈蛋白頭部即組織化學染色法所利用的 ATPase 之活性所在，可水解 ATP 提供能量使骨骼肌收縮。在小型哺乳類的骨骼肌中分離出 MHCI, MHCIIa, MHCIIb, MHCIIx 四種肌球重鏈蛋白的亞型。但後續在人類身上的許多研究指出，人類的骨骼肌中並不會表現收縮最快的肌球重鏈蛋白亞型 MHCIIb(8, 9)。所以人類骨骼肌中第 I 型肌肉纖維含 MHCI，第 IIA 型肌肉纖維含 MHCIIa，但第 IIB 型肌肉纖維所含的是 MHCIIx，並非之前所認為的 MHCIIb(3, 10)。

這個在一般實驗室中也可進行的 SDS-PAGE 分離方法發展出來以後，許多評估各亞型的肌球重鏈蛋白在不同年紀人類的骨骼肌中的組成比例，進而了解其因老化產生的相關變化的研究也開始進行。Monemi 等人(14, 15)與 Korfage 等人(16)比較人體不同部位骨骼肌中老化對肌球重鏈蛋白之亞型組成比例的影響，發現不同部位的骨骼肌會產生不同的變化。這些實驗呼應了組織化學染色研究中，老化對身體上不同部位的骨骼肌會產生不同的影響的研究結論。同時一些研究也證實：肌纖維的平均截面積與其中肌球重鏈蛋白亞型所佔比例有很好的相關性(17-19)。

評估各亞型的肌球重鏈蛋白(Myosin heavy chain, MHC)在不同年紀人類的眼輪匝肌中的組成比例，進而了解其因老化產生的相關變化。這種半定量的分析方法比起本實驗採用的肌纖維組織學染色方法可能更為準確，這將是我們下一階段的研究目標。藉由比較不同年紀病人的眼輪匝肌樣本，我們可以了解眼輪匝肌老化相關的變化，相信將來必對改善現有的眼睛四周年輕化技術，或開發新的年輕化方法提供重要的理論基礎。

七. 參考文獻:

1. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology* 1970;23(4):369-79.
2. Brooke MH, Kaiser KK. Three human myosin ATPase systems and their importance in muscle pathology. *Neurology* 1970;20(4):404-5.
3. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical Therapy* 2001;81(11):1810-6.
4. Coggan AR, Spina RJ, King DS, et al. Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. *Journal of Gerontology* 1992;47(3):B71-6.
5. Essen-Gustavsson B, Borges O. Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta Physiologica Scandinavica* 1986;126(1):107-14.
6. Monemi M, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging. *Journal of the Neurological Sciences* 1998;154(1):35-48.
7. Kirkeby S, Garbarsch C. Aging affects different human muscles in various ways. An image analysis of the histomorphometric characteristics of fiber

- types in human masseter and vastus lateralis muscles from young adults and the very old. *Histology & Histopathology* 2000;15(1):61-71.
8. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology* 1997;170:143-223.
 9. Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiologica Scandinavica* 1999;166(4):261-77.
 10. Staron RS. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Canadian Journal of Applied Physiology* 1997;22(4):307-27.
 11. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology* 1993;75(5):2337-40.
 12. Lodish H. Protein structures and function. in *Molecular cell biology*, 4th ed 2000:87.
 13. Bamman MM, Clarke MS, Talmadge RJ, Feeback DLIFDL. Enhanced protein electrophoresis technique for separating human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *Electrophoresis* 1999;20(3):466-8.
 14. Monemi M, Eriksson PO, Kadi F, Butler-Browne GS, Thornell LE. Opposite changes in myosin heavy chain composition of human masseter and biceps brachii muscles during aging. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 1999;20(4):351-61.
 15. Monemi M, Liu JX, Thornell LE, Eriksson PO. Myosin heavy chain composition of the human lateral pterygoid and digastric muscles in young adults and elderly. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 2000;21(4):303-12.
 16. Korfage JA, Schueler YT, Brugman P, Van Eijden TM. Differences in myosin heavy-chain composition between human jaw-closing muscles and supra- and infrahyoid muscles. *Archives of Oral Biology* 2001;46(9):821-7.
 17. Korfage JA, Van Eijden TM. Myosin heavy chain composition in human masticatory muscles by immunohistochemistry and gel electrophoresis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003;51(1):113-9.
 18. Fry AC, Allemeier CA, Staron RS. Correlation between percentage fiber type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology* 1994;68(3):246-51.
 19. Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, et al. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2000;48(5):623-9.

20. Goodmurphy CW, Ovalle WK. Morphological study of two human facial muscles: orbicularis oculi and corrugator supercilii. *Clin Anat* 1999;12(1):1-11.
21. Happak W, Burggasser G, Gruber H. Histochemical characteristics of human mimic muscles. *Journal of the Neurological Sciences* 1988;83(1):25-35.
22. Freilinger G, Happak W, Burggasser G, Gruber H. Histochemical mapping and fiber size analysis of mimic muscles. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1990;86(3):422-8.
23. Lander T, Wirtschafter JD, McLoon LK. Orbicularis oculi muscle fibers are relatively short and heterogeneous in length. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(9):1732-9.