

# 面肌和肢体骨骼肌对罗库溴铵敏感性差异与面神经诱发肌电位监测的研究

黄勇<sup>1,2</sup> 吴爽<sup>1</sup> 李士通<sup>1</sup> 魏薇<sup>1</sup> 陈莲华<sup>1</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学附属第一人民医院麻醉科 201620; <sup>2</sup>复旦大学附属中山医院麻醉科, 上海 200032

通信作者: 魏薇, Email: ryouki@163.com

**【摘要】目的** 研究面神经支配的肌肉和肢体神经支配的肌肉对罗库溴铵的敏感性是否存在差异, 探讨不同肌肉对罗库溴铵的敏感性差异是否与烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)亚基有关, 同时探索不同肌肉 nAChR 的表达差异是否与聚集蛋白( agrin)/低密度脂蛋白受体相关蛋白 4(low-density lipoprotein receptor-related protein 4, Lrp4)/肌肉特异性激酶(muscle-specific kinase, MuSK)信号调节通路(即 agrin/Lrp4/MuSK 通路)和神经调节素 1(neuregulin1, NRG1)/表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, ErbB)信号调节通路(即 NRG1/ErbB 通路)有关。**方法** 雄性 SD 大鼠 20 只取左侧口轮匝肌和腓肠肌分别分为口轮匝肌组(20 只)和腓肠肌组(20 只), 通过离体药效学检测两组肌肉对罗库溴铵的量效曲线, 计算药物半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。通过免疫荧光染色法检测两组肌肉 nAChR 的  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\gamma$  亚基的表达量。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测两组肌肉 agrin、Lrp4、MuSK、基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase, MMP3)、NRG1  $\beta$ 、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 罗库溴铵对口轮匝肌的 IC<sub>50</sub> 大于罗库溴铵对腓肠肌的 IC<sub>50</sub> ( $P < 0.05$ ); 口轮匝肌在单位肌肉横截面积上的 nAChR 亚基密度高于腓肠肌( $P < 0.05$ ); 口轮匝肌 NRG1 $\beta$ 、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的 mRNA 和蛋白表达高于腓肠肌 ( $P < 0.05$ ), 而 agrin、Lrp4、MuSK 和 MMP3 的 mRNA 和蛋白表达差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 面神经支配的肌肉对肌肉松弛药的敏感性低于肢体神经支配的肌肉, 其机制可能与单位肌肉横截面积上的 nAChR 亚基密度有关。口轮匝肌中 nAChR 亚基的高表达与 NRG1/ErbB 通路有关, 而与 agrin/Lrp4/MuSK 通路无关。

**【关键词】** 面肌; 骨骼肌; 面神经; 诱发肌电位; 罗库溴铵; 烟碱型乙酰胆碱受体

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81271075, 81870714)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.11.003

## A study of the differences in sensitivities to rocuronium between the facial muscles and limb skeletal muscles and facial muscle-evoked myogenic potential monitoring

Huang Yong<sup>1,2</sup>, Wu Shuang<sup>1</sup>, Li Shitong<sup>1</sup>, Wei Wei<sup>1</sup>, Chen Lianhua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, the First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201620, China;

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Wei Wei, Email: ryouki@163.com

**【Abstract】 Objective** To test the differences in sensitivities to rocuronium between facial nerve- and somatic nerve-innervated muscles, investigate whether the different muscle sensitivities to rocuronium are related to the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits, and explore the relationship between the differences in nAChR expression among these muscles and the agrin/low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4)/muscle-specific kinase (MuSK) and neuregulin1 (NRG1)/epidermal growth factor receptor (ErbB) signaling pathways. **Methods** The left sided orbicularis oris and gastrocnemius were obtained from male Sprague-Dawley rats. Their pharmacodynamic responses to rocuronium were detected in vitro, and the values of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were obtained according to dose-response curves. The levels of nAChR  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , and  $\gamma$  subunits were assessed by immunofluorescence. The mRNA and protein amounts of agrin, Lrp4, MuSK, matrix metalloproteinase (MMP3), NRG1, ErbB2, ErbB3, and ErbB4 were assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** The IC<sub>50</sub> value of the orbicularis oris to rocuronium was significantly higher than that of the gastrocnemius. The orbicularis oris presented a higher density of nAChR subunits in unit cross-sectional area than the gastrocnemius. The mRNA and protein amounts of NRG1 $\beta$ ,

ErbB2, ErbB3, and ErbB4 were higher in the orbicularis oris than those in the gastrocnemius. Meanwhile, no differences were observed in the mRNA or protein levels of agrin, Lrp4, MuSK, or MMP3. **Conclusions** Facial nerve-innervated muscle is less sensitive to skeletal muscular relaxants than somatic nerve-innervated muscle, which may be related to the density of nAChR subunits in unit cross-sectional area. The higher expression of nAChR subunits in the orbicularis oris may be related to the NRG1/ErbB signaling pathway, rather than the agrin/Lrp4/MuSK signaling pathway.

**【Key words】** Facial muscles; Skeletal muscles; Facial nerve; Evoked myogenic potentials; Rocuronium; Nicotinic acetylcholine receptor

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (General Program) (81271075, 81870714)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.11.003

面神经诱发肌电位监测可用于定位面神经在肌肉和软组织中的位置和走行,以避免手术操作损伤面神经,在临床上广泛应用于神经外科、耳-颅底外科等手术中<sup>[1]</sup>。其中,进行面神经监测的前提条件是确保面神经和肌肉之间有足够神经信号转导,而术中应用肌肉松弛药(肌松药)成为限制面神经监测的重要因素。目前研究发现,部分外周神经肌肉阻滞技术(partial neuromuscular blockade, PNMB)既能减少肌松药对面神经和肌肉之间神经信号转导的影响,同时又能保留肌松药对骨骼肌的松弛效应<sup>[2-3]</sup>。本课题组前期在使用 PNMB 的手术中发现,即使一部分患者肢体骨骼肌达到 100%阻滞时,仍能检测到面神经诱发肌电位反应振幅,该结果提示肢体骨骼肌和面肌对肌松药的敏感性可能存在差异<sup>[4-5]</sup>。神经肌接头上的烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)是肌松药的结合位点,nAChR 是由 5 个不同的亚基组合( $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\gamma$ ),形成成熟型  $\epsilon$ -nAChR [ $(\alpha 1)2\beta 1\delta\epsilon$ ]和胚胎型  $\gamma$ -nAChR [ $(\alpha 1)2\beta 1\delta\gamma$ ]<sup>[6]</sup>。不同的亚基构成比会表现出不同的药理学和生理学特性,从而也对不同的非去极化肌松药表现出不同的敏感性<sup>[7]</sup>。此外,nAChR 的表达调控受到聚集蛋白(agrin)/低密度脂蛋白受体相关蛋白 4(low-density lipoprotein receptor-related protein 4, Lrp4)/肌肉特异性激酶(muscle-specific kinase, MuSK)信号调节通路(即 agrin/Lrp4/MuSK 通路)和神经调节素 1(neuregulin1, NRG1)/表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, ErbB)信号调节通路(即 NRG1/ErbB 通路)的影响。

因此,本研究拟验证面肌和肢体骨骼肌对肌松药的药效学敏感性是否存在不同,同时进一步探讨不同肌肉对肌松药的敏感性差异是否与 nAChR 的表达及其上游信号通路有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

20 只雄性 SD 大鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司),体重 200~250 g,清洁级。本实验获得上海交通大学附属第一人民医院动物实验伦理委员会审批通过。

### 1.2 口轮匝肌和腓肠肌标本制备

每只大鼠麻醉后取左侧口轮匝肌和左侧腓肠肌,分别分为口轮匝肌组(20 只)和腓肠肌组(20 只)。玻璃分针分离面神经颊支和胫神经,分离出带有面神经的口轮匝肌和带有胫神经的腓肠肌,浸泡于 Krebs 液中,修剪成宽约 1 cm 的肌条备用。肌肉标本在完成离体药效学测定后再用于后续试验。

### 1.3 离体药效学测定肌肉对罗库溴铵的反应

将带有面神经的口轮匝肌和带有胫神经的腓肠肌迅速置于充满 Krebs 液的 37 °C 恒温浴槽(型号:ALC-M,上海奥尔科特公司)中。肌肉的一端与张力换能器连接,将神经缠绕刺激电极,刺激强度 15 V,波宽 0.05 ms,频率 0.1 Hz,间隔时间 5 s。肌肉在完成基础最大肌张力振幅(muscular tension amplitude, MTA)测量后,采用累积给药的方法,依次获得 0.01、0.1、1.0、2.0、5.0、6.0、7.0、10.0、12.0、15.0、20.0、30.0、40.0  $\mu\text{mol/L}$  的罗库溴铵(生产批号:R026110,Organon 公司,荷兰)浓度,每次追加罗库溴铵后平衡 10 min 再进行刺激,每个浓度电刺激 5 次。

### 1.4 半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, $\text{IC}_{50}$ )计算

两组肌肉未加肌松药时的基础 MTA 数值作为对照值,加入肌松药之后的 MTA 数值与基础 MTA 数值之比用于药效学分析。采用 GraphPad Prism 6 软件,选择 four-variable logistic sigmoidal 量效曲线

模型,用非线性回归拟合出罗库溴铵的量效曲线,同时计算罗库溴铵的  $IC_{50}$  和量效曲线斜率。

### 1.5 免疫荧光染色

将肌肉标本固定后脱水,液氮速冻 30 s。将标本包埋后连续冰冻切片,片厚 30  $\mu\text{m}$ 。10%驴血清封闭后,分别加入抗  $\beta 1$  亚基抗体(1:100,生产批号:sc-1448,Santa Cruz 公司,美国)、抗  $\delta$  亚基抗体(1:200,生产批号:ab2804,Abcam 公司,英国)、抗  $\epsilon$  亚基抗体(1:100,生产批号:sc-1455,Santa Cruz 公司,美国)、抗  $\gamma$  亚基抗体(1:100,生产批号:sc-1453,Santa Cruz 公司,美国),同时加入抗神经丝蛋白 200(neurofilament 200,NF-200)抗体(1:200,生产批号:N4142,Sigma-Aldrich,美国),于 4  $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育过夜。PBS 洗片后,分别加入  $\beta 1$  亚基抗体对应的 AlexaFluor 594 结合的二抗(1:1 000,生产批号:A11058,Life 公司,美国)、 $\delta$  亚基抗体对应的 AlexaFluor 594 结合的二抗(1:1 000;生产批号:A21203,Life 公司,美国)、 $\epsilon$  亚基抗体对应的 AlexaFluor 594 结合的二抗(1:1 000,生产批号:A11058,Life 公司,美国)、 $\gamma$  亚基抗体对应的 AlexaFluor 594 结合的二抗(1:1 000,生产批号:A11058,Life 公司,美国),同时加入 NF200 抗体对应的 AlexaFluor 647 结合的二抗(1:1 000,生产批号:A31573,Life 公司,美国)和 AlexaFluor 488 标记的  $\alpha$  银环蛇毒素(1:1 000,生产批号:B13422,Life 公司,美国),室温避光孵育 1 h。PBS 洗片后,抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜(型号:TCS SP8,莱卡公司,德国)观察。

神经肌接头是神经纤维末梢与肌纤维膜形成的突触样结构, $\alpha$  银环蛇毒素是银环蛇产生的神经毒素之一,能够特异地结合神经肌接头后膜肌纤维膜上 nAChR 的  $\alpha 1$  亚基,而 AlexaFluor 488 是一种绿色荧光二抗,因此使用 AlexaFluor 488 标记的  $\alpha$  银环蛇毒素可以特异地定位神经肌接头的接头后膜,在共聚焦显微镜下呈现为绿色荧光。NF-200 是构成神经细胞轴突中间丝的蛋白质,抗 NF-200 抗体常用于定位神经的走行,因此其能用于定位神经肌接头的接头前膜神经纤维末梢。

### 1.6 肌肉和神经肌接头形态学分析

通过 Image-Pro Plus 软件分析口轮匝肌和腓肠肌的肌肉横截面积(cross-sectional area, CSA)和运动终板面积(endplate surface area, ESA),每块肌肉中至少有 50 个神经肌接头及对应的肌纤维用于分

析,同时计算运动终板荧光强度。

### 1.7 RT-PCR 检测两组肌肉中 agrin/Lrp4/MuSK 和 NRG1/ErbB 信号调节通路的关键因子 mRNA 含量

使用 Trizol 试剂从肌肉中提取总 RNA。取 1  $\mu\text{g}$  mRNA 加入逆转录试剂,42  $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,95  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min 获得 cDNA 模板。使用 SYBR Green 进行扩增,反应条件如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 60 s,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s 共 40 个循环,95  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s。agrin 基因上游引物 5'-AATGGGCAGAAG ACAGATGG,下游引物 5'-AATGGGCAGAAGACA GATGG;Lrp4 基因上游引物 5'-CTGTGCCCA GAAGTGTGACA,下游引物 5'-CCCTCCTCAGCA CATTTCATT;MuSK 基因上游引物 5'-TGCGGA ACAGCTCTGTATTG,下游引物 5'-TCACCACCA TGTTCTCTCCA;MMP3 基因上游引物 5'-CTGGAA TGTCCTTGGCTCAT,下游引物 5'-GAGCAGCAA CCAGGAATAGG;NRG1  $\beta$  基因上游引物 TGCGGAGAAGGAGAAACTTTC,下游引物 5'-AACGATCACCAGTAAACTCATTTGG;ErbB2 基因上游引物 5'-TCTACGGAAGTGGGATCCTG,下游引物 5'-GACCATAGCACACTCGAGCA;ErbB3 基因上游引物 5'-CGAGATGGGCAACTCTCAGGC,下游引物 5'-AGGTTACCATGACCACCTCACAC;ErbB4 基因上游引物 5'-TGCGGGCAATATCTACATCA,下游引物 5'-CTCAGCCCTCCTGTTGTCTC;GAPDH 上游引物 5'-GAAGGGCTCATGACCACAGT,下游引物 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT。以 GAPDH 为内参,腓肠肌与口轮匝肌之间的表达差异以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  表示。

### 1.8 Western blot 检测两组肌肉 agrin/Lrp4/MuSK 和 NRG1/ErbB 信号调节通路的关键蛋白含量

称取大鼠肌肉组织,加入蛋白裂解液进行组织匀浆,离心后抽取上清液。按 BCA 法测定样本蛋白浓度,煮沸离心(3 000 r/min,1 min,离心半径 10 cm)后得到上样液,30  $\mu\text{g}$  蛋白在 10%分离胶上恒压电泳,然后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭。分别加入 agrin 一抗(1:2 000,生产批号:AF550,R&D 公司,美国)、Lrp4 一抗(1:500,生产批号:AF5948,R&D 公司,美国)、MuSK 一抗(1:1 000,生产批号:AF562,R&D 公司,美国)、MMP3 一抗(1:2 000,生产批号:ab52915,abcam 公司,英国)、ErbB2 一抗(1:1 000,生产批号:SAB4300351,Sigma-Aldrich,美国)、ErbB3 一抗(1:1 000,生产批号:ab32121,

abcam 公司,英国)、ErbB4 一抗(1 : 2 000,生产批号:ab32375,abcam 公司,英国),4 ℃摇床孵育过夜,加入辣根过氧化物酶耦合的二抗,室温摇床孵育 1 h, ECL 发光后显影拍照,用 Quantity One 图像分析软件进行半定量分析。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,正态分布的计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,IC<sub>50</sub> 以均数和 95%CI [ $\bar{x}$  (95%CI)] 表示。口轮匝肌和腓肠肌统计学比较采用配对 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗库溴铵对腓肠肌和口轮匝肌的药效学比较

在两个实验组中,罗库溴铵浓度依赖性地降低间接刺激下腓肠肌和口轮匝肌的单收缩张力。与腓肠肌组相比,口轮匝肌组罗库溴铵的量效曲线发生明显右移,IC<sub>50</sub> 明显增大(*P*<0.05,图 1、表 1)。罗库溴铵量效曲线的斜率两组之间差异没有统计学意义(*P*>0.05,表 1)。

2.2 腓肠肌和口轮匝肌 nAChR 各亚基的表达及神经肌接头形态学观察

腓肠肌和口轮匝肌的 nAChR 表达  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  4 种亚基,并且这 4 种亚基表达位置均位于神经肌接头上,同时两种肌肉的 nAChR 均不表达  $\gamma$  亚基(图 2A、B)。通过 Image-Pro Plus 软件分析两种肌肉各个亚基的荧光强度,发现口轮匝肌 nAChR 的  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚基的荧光强度与腓肠肌相比较差

异无统计学意义,即两种肌肉 nAChR 密度一致。比较口轮匝肌和腓肠肌的 CSA 和 ESA,发现口轮匝肌 CSA 和 ESA 均小于腓肠肌(*P*<0.05,表 2),但口轮匝肌在单位 CSA 上拥有更大的 ESA(ESA/CSA,*P*<0.05,表 2),而两种肌肉的运动终板 nAChR 密度一致,因此口轮匝肌在单位 CSA 上表达了更多的 nAChR。

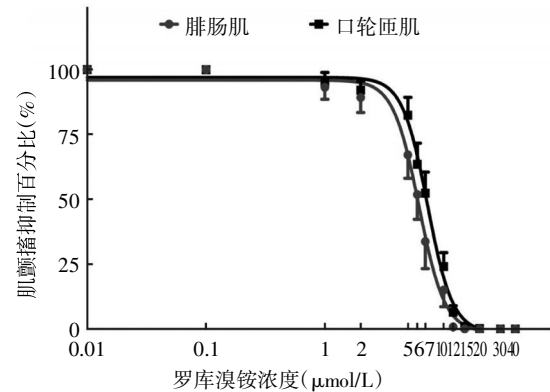


图 1 口轮匝肌和腓肠肌罗库溴铵量效曲线

表 1 罗库溴铵对腓肠肌和口轮匝肌 IC<sub>50</sub> 及量效曲线斜率

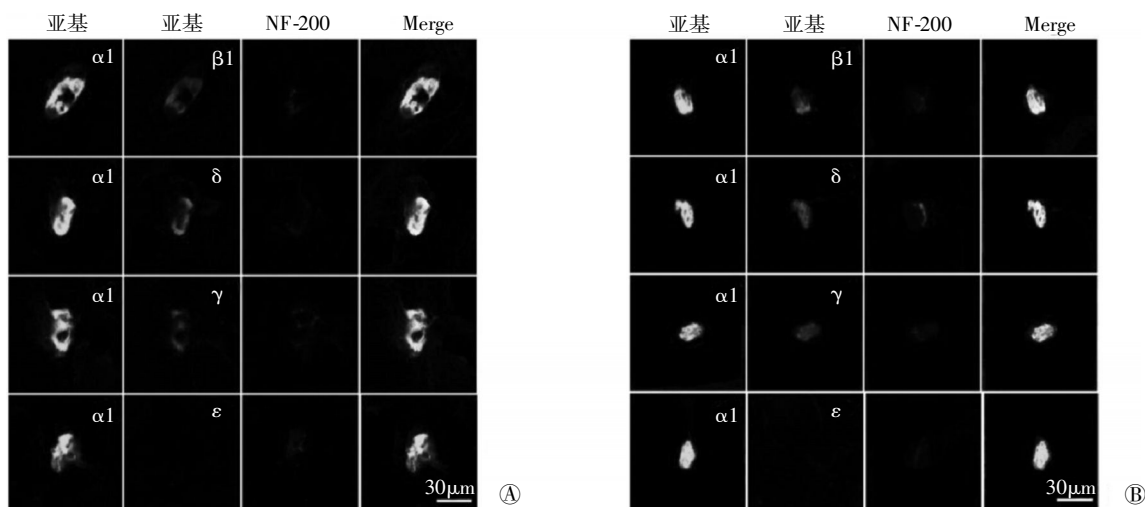
组别	动物数(只)	IC <sub>50</sub> [ $\bar{x}$ (95%CI)]	斜率( $\bar{x}\pm s$ )
腓肠肌组	20	6.19(6.02~6.38)	4.00±0.26
口轮匝肌组	20	7.31(7.12~7.49) <sup>a</sup>	4.11±0.18

注:与腓肠肌组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;IC<sub>50</sub>:半数抑制浓度

表 2 腓肠肌和口轮匝肌 CSA 和 ESA 比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	CSA(μm <sup>2</sup> )	ESA(μm <sup>2</sup> )	ESA/CSA
腓肠肌组	20	630±48	250±25	0.39±0.09
口轮匝肌组	20	301±87 <sup>a</sup>	147±34 <sup>a</sup>	0.52±0.23 <sup>a</sup>

注:与腓肠肌组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;CSA:肌肉横截面积;ESA:运动终板面积



注:NF-200:神经丝蛋白 200;nAChR:烟碱型乙酰胆碱受体

图 2 腓肠肌和口轮匝肌 nAChR 的  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\gamma$  亚基在神经肌接头上的表达 A:腓肠肌;B:口轮匝肌

### 2.3 腓肠肌和口轮匝肌 agrin/Lrp4/MuSK 通路 mRNA 和蛋白表达

与神经支配的腓肠肌相比,面神经支配的口轮匝肌中 agrin、Lrp4、MuSK 和 MMP3 的 mRNA 表达差异没有统计学意义( $P>0.05$ ,图 3A)。口轮匝肌 agrin、Lrp4、MuSK 和 MMP3 的蛋白表达与腓肠肌相比差异没有统计学意义( $P>0.05$ ,图 3B、C)。

### 2.4 腓肠肌和口轮匝肌 NRG1/ErbB 通路 mRNA 和蛋白表达

与腓肠肌比较,口轮匝肌中 NRG1 $\beta$ 、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的 mRNA 表达高于腓肠肌( $P<0.05$ ,图 4A)。此外,口轮匝肌 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的蛋白表达也高于腓肠肌( $P<0.05$ ,图 4B、C)。

## 3 讨论

在本研究中,罗库溴铵对面神经支配的口轮匝肌和胫神经支配的腓肠肌的 IC<sub>50</sub> 作为衡量两种肌肉对肌松药的药效学反应。实验结果显示,罗库溴铵对口轮匝肌的 IC<sub>50</sub> 数值大于罗库溴铵对腓肠肌的

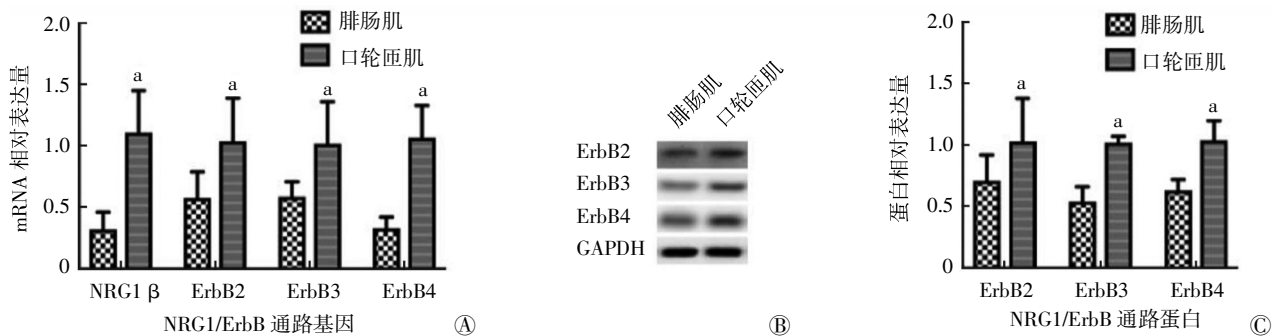
IC<sub>50</sub> 数值,这说明面神经支配的肌肉相比于肢体神经支配的肌肉对罗库溴铵更不敏感。

本研究为 PNMB 用于临床提供了理论依据。部分神经肌肉阻滞技术即在手术中给予一定量的去极化肌松药,使神经肌接头上的一部分 nAChR 被肌松药所拮抗而产生骨骼肌松弛效应,同时又有一部分 nAChR 未被肌松药所结合而保留一定程度的神经肌肉冲动信号转导功能<sup>[8-9]</sup>。由于面神经支配的口轮匝肌相比于肢体神经支配的肌肉对肌松药不敏感,部分神经肌肉阻滞技术既可以确保神经外科手术中进行面神经诱发肌电位监测的反应性,同时也可以确保全身麻醉过程中患者绝对的制动。与之相反的是,对于术中需行面神经诱发肌电位监测的手术,如果不采用部分神经肌肉阻滞技术,即术中不使用肌松药而使用大剂量的静脉或吸入全身麻醉药物维持较深的麻醉深度,虽然较深的麻醉深度可以确保患者绝对的制动,但可能会引起患者血流动力学不稳定,甚至会引起患者苏醒延迟等不良事件的发生<sup>[10]</sup>。因此,本研究发现面神经支配的口轮匝



注: agrin: 聚集蛋白; Lrp4: 低密度脂蛋白受体相关蛋白 4; MuSK: 肌肉特异性激酶; MMP3: 基质金属蛋白酶 3

图 3 腓肠肌和口轮匝肌 agrin/Lrp4/MuSK 通路中关键因子 agrin、Lrp4、MuSK 和 MMP3 表达 A: mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测结果; C: 蛋白相对表达量



注: 与腓肠肌组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; NRG1: 神经调节素 1; ErbB: 表皮生长因子受体

图 4 腓肠肌和口轮匝肌 NRG1/ErbB 通路中关键因子 NRG1  $\beta$ 、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 表达 A: mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测结果; C: 蛋白相对表达量

肌相比于体神经支配的肌肉对肌松药不敏感,可以指导麻醉医师合理使用肌松药,对于神经外科手术中面神经诱发肌电位的监测具有重要的临床意义。

目前研究发现不仅口轮匝肌与腓肠肌对肌松药敏感性不同,还发现多种肌肉对肌松药的敏感性不同,比如咬肌、膈肌、腹直肌、甲杓肌、比目鱼肌和胫骨前肌等<sup>[11-12]</sup>。不同肌肉对肌松药敏感性差异的机制可能与血流灌注、体温、ESA、肌纤维大小、肌纤维的分型、nAChR 和乙酰胆碱的量子式释放有关。在本研究中,我们通过聚焦于 ESA、肌纤维大小和 nAChR 亚基以探究口轮匝肌和腓肠肌对肌松药敏感性差异的可能机制。

我们研究发现口轮匝肌和腓肠肌的 nAChR 亚型表达一致,只表达  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚基而不表达  $\gamma$  亚基,并且亚基表达位置均位于神经肌接头上。尽管口轮匝肌和腓肠肌所有亚基的荧光强度即密度一致,但是由于口轮匝肌有着相对更小的 CSA,所以口轮匝肌在单位 CSA 上的 nAChR 密度大于腓肠肌。Ibebunjo 等<sup>[13]</sup>指出肌松药敏感性可能跟 ESA 与肌纤维横截面积的比值呈负相关,即如果肌肉的 ESA 与肌纤维横截面积的比值更大,则其对肌松药更不敏感,这与我们的发现不谋而合。考虑到口轮匝肌拥有更大的 ESA 与肌纤维横截面积比值,而口轮匝肌和腓肠肌的 nAChR 荧光强度即密度一致,那么口轮匝肌在单位 CSA 上就有着更多的 nAChR。当相同浓度的肌松药作用于腓肠肌和口轮匝肌,腓肠肌上绝大多数的 nAChR 都被肌松药所阻断,此时口轮匝肌仍有为数众多的未被结合的 nAChR 能够参与神经冲动的传导,使得其对肌松药更不敏感<sup>[14]</sup>。

神经肌接头 nAChR 亚基的表达受到 agrin/Lrp4/MuSK 和 NRG1/ErbB 两种信号调节通路的调控<sup>[15]</sup>。运动神经分泌产生的糖蛋白 agrin 对于 nAChR 的产生和维持不可或缺。agrin 是通过神经末梢分泌产生,然后与 Lrp4 结合,进而磷酸化 MuSK。被磷酸化的 MuSK 与停靠蛋白 7 以及其他细胞内蛋白刺激突触后膜受体缔合蛋白,使 nAChR 聚集和固定于神经肌接头的接头后膜上<sup>[16]</sup>。NRG1 与 ErbB 受体结合,促进 nAChR 在神经肌接头的转录增加<sup>[17-18]</sup>。因此,如果 agrin/Lrp4/MuSK 和 NRG1/ErbB 通路中的关键因子在不同肌肉中表达不同,可能会引起

nAChR 在不同肌肉中产生差异。

我们检测了口轮匝肌和腓肠肌中两条通路关键信号因子的表达,发现无论是在 mRNA 还是蛋白水平,两种肌肉的 agrin、Lrp4、MuSK 和 MMP3 的表达差异均没有统计学意义,说明 agrin/Lrp4/MuSK 通路可能并不是引起 nAChR 在口轮匝肌神经肌接头中高表达的原因。而 NRG1 $\beta$ 、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 在正常口轮匝肌中的表达高于腓肠肌,说明 NRG1/ErbB 通路可能是引起 nAChR 亚基在口轮匝肌神经肌接头中高表达的原因。

NRG1 是一种神经调节蛋白,能够激活表皮生长因子受体家族酪氨酸激酶受体 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4<sup>[18]</sup>。有研究发现,NRG1 基因敲除杂合子小鼠虽然能够生长也能够繁殖后代,但是其神经肌接头上的 nAChR 数量与对照组比较减少 50%。当选择性地敲除小鼠骨骼肌中的 ErbB2 和 ErbB4 基因来破坏 NRG1/ErbB 通路时,小鼠能够存活到成年也能够产生后代,但是其神经肌接头上的 nAChR 密度减少 10%,mRNA 减少 20%~30%<sup>[19]</sup>。这些研究结果说明 NRG1/ErbB 通路对于 nAChR 在神经肌接头上的高表达至关重要。NRG1 可以分为  $\alpha$  和  $\beta$  两种亚型,而 NRG1 $\beta$  亚型要远远高于  $\alpha$  亚型的活性,因此本实验研究对象只选取了 NRG1 $\beta$  亚型。此外,在蛋白水平上分析 NRG1 $\beta$  亚型的表达是一件极其困难的事情,因为 NRG1 存在多种亚型,且这些亚型之间可能存在着相同的外显子<sup>[17,20]</sup>,因此我们只在 mRNA 水平检测了 NRG1 $\beta$  亚型的表达。

综上所述,本研究发现面神经支配的肌肉对肌松药的敏感性低于肢体神经支配的肌肉,其机制可能与单位 CSA 的 nAChR 密度有关。NRG1/ErbB 通路可能是引起 nAChR 亚基在口轮匝肌神经肌接头中高表达的原因。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Huang X, Ren J, Xu J, et al. The utility of "low current" stimulation threshold of intraoperative electromyography monitoring in predicting facial nerve function outcome after vestibular schwannoma surgery: a prospective cohort study of 103 large tumors[J]. J Neurooncol, 2018, 138 (2): 383-390. DOI:10.1007/s11060-018-2806-8.
- [2] Vega-Céliz J, Amilibia-Cabeza E, Prades-Martí J, et al. Our

- experience with facial nerve monitoring in vestibular schwannoma surgery under partial neuromuscular blockade [J]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2015, 66(4): 192-198. DOI:10.1016/j.otorri.2014.08.002.
- [3] Sloan TB. Muscle relaxant use during intraoperative neurophysiologic monitoring [J]. *J Clin Monit Comput*, 2013, 27 (1): 35-46. DOI:10.1007/s10877-012-9399-0.
- [4] Cai YR, Xu J, Chen LH, et al. Electromyographic monitoring of facial nerve under different levels of neuromuscular blockade during middle ear microsurgery[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122 (3): 311-314. DOI:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.03.014.
- [5] Xing Y, Chen L, Li S. Evoked electromyography to rocuronium in orbicularis oris and gastrocnemius in facial nerve injury in rabbits[J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 198-205. DOI:10.1016/j.jss.2013.05.087.
- [6] Martyn JA, Fagerlund MJ, Eriksson LI. Basic principles of neuromuscular transmission [J]. *Anaesthesia*, 2009, 64 (Suppl 1): 1-9. DOI:10.1111/j.1365-2044.2008.05865.x.
- [7] Wang H, Fu W, Liu G, et al. Effects of skeletal muscle denervation on the potency of succinylcholine[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (5): 7796-7800. DOI:10.3892/mmr.2015.4392.
- [8] Kim SH, Jin SJ, Karm MH, et al. Comparison of false-negative/positive results of intraoperative evoked potential monitoring between no and partial neuromuscular blockade in patients receiving propofol/remifentanyl-based anesthesia during cerebral aneurysm clipping surgery: a retrospective analysis of 685 patients[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(34): e4725. DOI:10.1097/MD.0000000000004725.
- [9] 李佳玉, 王薇, 刘俊鹏, 等. 部分神经肌肉阻滞在神经电生理监测中的应用[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(9): 851-855. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2017.09.019.
- [10] Gueret G, Rossignol B, Kiss G, et al. Is muscle relaxant necessary for cardiac surgery?[J]. *Anesth Analg*, 2004, 99 (5): 1330-1333. DOI:10.1213/01.ane.0000132984.56312.ff.
- [11] Ibebunjo C, Srikant CB, Donati F. Duration of succinylcholine and vecuronium blockade but not potency correlates with the ratio of endplate size to fibre size in seven muscles in the goat [J]. *Can J Anaesth*, 1996, 43 (5 Pt 1): 485-494. DOI:10.1007/BF03018111.
- [12] Ibebunjo C, Srikant CB, Donati F. Morphological correlates of the differential responses of muscles to vecuronium [J]. *Br J Anaesth*, 1999, 83(2): 284-291. DOI:10.1093/bja/83.2.284.
- [13] Ibebunjo C, Srikant CB, Donati F. Properties of fibres, endplates and acetylcholine receptors in the diaphragm, masseter, laryngeal, abdominal and limb muscles in the goat[J]. *Can J Anaesth*, 1996, 43(5 Pt 1): 475-484. DOI:10.1007/BF03018110.
- [14] Zhou RY, Xu J, Chi FL, et al. Differences in sensitivity to rocuronium among orbicularis oris muscles innervated by normal or damaged facial nerves and gastrocnemius muscle innervated by somatic nerve in rats: combined morphological and functional analyses [J]. *Laryngoscope*, 2012, 122 (8): 1831-1837. DOI:10.1002/lary.23286.
- [15] Burden SJ, Huijbers MG, Remedio L. Fundamental molecules and mechanisms for forming and maintaining neuromuscular synapses[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): E490. DOI:10.3390/ijms19020490.
- [16] Tezuka T, Inoue A, Hoshi T, et al. The MuSK activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(46): 16556-16561. DOI:10.1073/pnas.1408409111.
- [17] Ronchi G, Haastert-Talini K, Fornasari BE, et al. The Neuregulin1/ErbB system is selectively regulated during peripheral nerve degeneration and regeneration [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(3): 351-364. DOI:10.1111/ejn.12974.
- [18] Wang J, Song F, Loeb JA. Neuregulin1 fine-tunes pre-, post-, and perisynaptic neuromuscular junction development [J]. *Dev Dyn*, 2017, 246(5): 368-380. DOI:10.1002/dvdy.24494.
- [19] Escher P, Lacazette E, Courtet M, et al. Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors [J]. *Science*, 2005, 308 (5730): 1920-1923. DOI:10.1126/science.1108258.
- [20] Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP. Targeting transcription to the neuromuscular synapse[J]. *Neuron*, 2001, 31 (1): 15-22. DOI:10.1016/s0896-6273(01)00353-1.

(本文编辑:孙婷)