

实验性牙髓炎疼痛诱发 c-fos 在中枢内的表达

林正梅, 程 斌, 凌均[✉], 陈小华

(中山医科大学附属光华口腔医院内科, 广东 广州 510055)

摘 要:【目的】了解实验性牙髓炎疼痛信号在中枢的传导特点。【方法】应用免疫组织化学方法检测牙髓炎疼痛诱发中枢神经系统(central nerve system, CNS)c-fos 的表达。【结果】牙髓炎疼痛能诱导 c-fos 在 CNS 内呈时间依赖性表达。诱痛后 2 h 为 Fos 免疫阳性神经元(Fos-like immunoreactivity neuron, FLN)的表达高峰, 4 h 左右开始减弱。FLN 除了密集分布在三叉神经脊束核尾侧亚核(nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve, caudal part, sp5c)的 I、II 层外, 极间核、口核、感觉主核、躯体感觉皮层等可见 FLN 的表达; 臂旁核、室旁核、中央杏仁核等与痛调节有关的内脏中继核团亦可见 FLN 的表达。【结论】在三叉神经脑干复合体中, 所有三叉神经脊束核均参与了牙痛的传导, 但以尾侧亚核的第二层为主; 此外, 与内脏调节有关的核团亦参与了牙痛的传导和调节作用。

关键词: 牙髓炎/病理学; 神经传导; 基因, c-fos

中图分类号: R781.31 文献标识码: A 文章编码: 1000-257X(2000)04-0256-04

Expression and Effect of c-fos Gene in Central Nerve System Induced by Experimental Pulpitis Pain

LIN Zheng-mei, CHENG Bin, LING Jun-qi, CHEN Xiao-hua

(Guanghua Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the transmission signal of the experimental pulpitis pain. 【Method】The immunohistochemical method was used to detect Fos expression in Central Nerve System (CNS) induced by pulpitis pain. 【Results】Time-dependant expression of c-fos in CNS induced by pulpitis pain was observed. The peak of Fos-like immunoreactivity neuron (FLN) appeared 2 hours after the stimulation. FLN densely distributed not only in the I、II layers of trigeminal caudal nucleus, but also in interpolar nucleus, oral nucleus, main sensory and body cerebral cortex. FLN were also seen in the nucleus associated with pain regulation such as parabrachial nucleus and nucleus of solitary tract. 【Conclusion】The neurons of trigeminal brainstem complex are involved in transduction of dental pain signal, with the dominant role played by the second layer of caudalis. Some nucleus related to the regulation of viscera are taken part in this process.

Key words: pulpitis / pathology; neural conduction; gene, c-fos

牙髓炎是最常见的口腔疾病之一,它具有冷热刺激痛、自发痛、夜间痛及放散痛等显著的疼痛特点。但目前牙痛信号在二级神经元(三叉神经复合体)内的传导途径仍未明确。Hu 等^[1]根据神经解剖学和电生理学研究成果提出,三叉神经脊束核是面部浅感觉信号的中继核团,尤其三叉神经脊束核

尾侧亚核(nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve, caudal part, sp5c)是面部痛觉信号传入的重要驿站;而 Takemura 等^[2]发现,猴牙髓传入神经在尾侧亚核仅有稀少投射,因而认为 sp5c 甚至整个三叉神经脊束核在牙痛信号传导中的作用仍有待明确。

收稿日期: 1999-12-22

基金项目: 中山医科大学科研基金(1996)

作者简介: 林正梅(1966-),女,广东梅州人,硕士,讲师

c-fos 基因与疼痛密切相关,是细胞信息传递过程中的“核内第三信使”,它能将细胞外短时程的刺激转换成时程的细胞效应,研究发现在外周刺激所引起的神经元活动过程中,c-fos 基因被激活并表达 Fos 蛋白^[3],用免疫组织化学方法可检测 Fos 蛋白在中枢神经系统(Central Nerve System, CNS)内的表达及分布特点,从而可显示中枢神经系统内的功能通路^[4]。本文拟在建立实验性牙髓炎疼痛模型的基础上,用免疫组织化学方法检测脑内 Fos 免疫阳性神经元(Fos-like immunoreactivity neuron, FLN)的分布及规律,以了解牙痛刺激信号在中枢内的传导途径,初步探讨牙痛的中枢传导机制。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与处理

空白对照组(A组):9只SD大白鼠,不作任何处理,安静环境下饲养;牙髓炎诱痛组(B组):45只SD大白鼠,均先建立实验性牙髓炎模型,封细菌内毒素后24h于乙醚麻醉下用烧热的充填器反复刺激牙唇面,直到清醒,并观察其嘶叫情形,诱痛后存活时间与动物数分别为0.5h(9只)、1h(9只)、2h(9只)、4h(9只)、8h(9只);吗啡注射组(C组):9只SD大白鼠,先建立实验性牙髓炎诱痛模型,在热刺激前0.5h腹腔注射吗啡(10mg/kg),诱痛后存活2h。

1.2 取 材

各组动物存活至预定时间后行腹腔麻醉,经质量浓度40g/L中性多聚甲醛心脏灌注固定,断头,用大鼠脑立体定位仪定位,取块,恒冷冰冻切片机连续切片,40 μ m厚,用体积分数3mL/L H₂O₂接片,待处理。

1.3 免疫组织化学染色步骤

上述切片用LSAB法及GDN(硫酸镍铵加强染色)法进行漂染。实验步骤简述如下:切片用1mL正常羊血清(含3 μ L Tritone X-100)4 $^{\circ}$ C下孵育0.5h;转入稀释度为1:1000的Fos单抗溶液(Santa Cruz),4 $^{\circ}$ C下孵育24h;转入二抗溶液(生物素标记的抗小鼠IgG),4 $^{\circ}$ C下孵育24h;转入三抗溶液(辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素复合物),室温下轻摇2h;DAB法显色,缓慢加入硫酸镍铵葡萄糖氧化酶混合液加强染色;裱片;室温下风干,梯度脱水,透明;封片。实验中用PBS代替一抗作

阴性对照。

1.4 Fos 表达的测量

核团内神经元细胞核呈棕黑色染色者为阳性细胞;高倍镜下($\times 40$)在一个核团内随机选择5个视野,利用测试网格计算每个视野中的阳性颗粒数,再取5个视野的平均值,则为该核团的平均阳性颗粒数。

1.5 统计学处理

q 检验(Newman-keuls法),检验水准双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 Fos 在实验性牙髓炎鼠中枢的表达

在牙髓炎症情况下施予反复热刺激,实验鼠CNS内c-fos基因被激活,表现为各核团出现数量不等的FLN(图1、表1)。从sp5c、孤束核(nucleus of solitary tract)、室旁核(paraventricular nucleus)、臂旁核(parabrachial nucleus)、大脑皮层(cerebral cortex)这5个有代表性的核团观察到:诱痛后0.5h,FLN的数量开始增多;1~2hFLN的数量达到高峰;4h后FLN的数量开始减少,直至8hFLN数量又基本恢复至未刺激时的状态。其余核团也观察到类似的现象,说明FLN在脑内各核表达的数量呈时间依赖性。

表1 FLN在大鼠中枢系统内的表达

Table 1 Expression of FLN in rat's CNS

Time	0.5h	1h	2h	4h	8h
Caudalis	+	+++	+++	++	+
Interparietalis	-	+	+	-	-
Oralis	-	+	+	-	-
Principal sensory nucleus	-	+	+	-	-
Nucleus of solitary tract	+	++	++	+	+
Periphery gray of central canal	+	+	+	-	-
Paraventricular nucleus	+	++	++	+	-
Parabrachial nucleus	+	++	++	+	-
Locus ceruleus	+	+	+	+	-
Cerebral cortex	+	++	++	+	-

2.2 各核团 FLN 分布的特点

2.2.1 三叉神经脊束核尾侧亚核 空白对照组的sp5c内仅见极少量的FLN分布(5.4 \pm 2.8)。牙髓炎疼痛后2h,sp5c的I、II层背腹侧和中间部分可

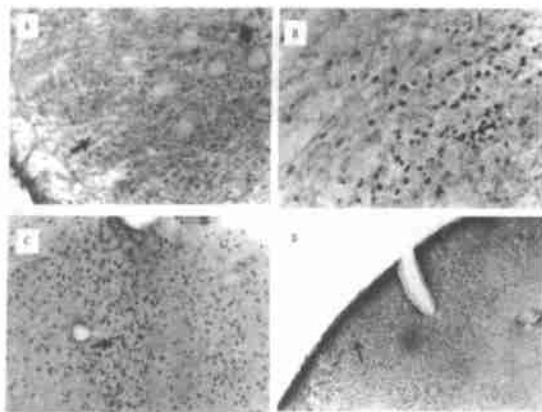


图1 牙髓炎诱痛后2h中枢神经系统内Fos的表达

Fig. 1 Fos expressed in central nerve system after 2h of the pulpitis pain

A: Fos distributed densely in the I and II layers of the trigeminal caudalis. (LSAB+GDN, $\times 100$); B: Fos expressed in the trigeminal interpolaris. (LSAB+GDN, $\times 100$); C: Fos expressed largely in the parabrachial nucleus. (LSAB+GDN, $\times 100$); D: Fos appeared in the cerebral cortex. (LSAB+GDN, $\times 50$)

见较为密集的FLN (72.8 ± 9.7 , $P < 0.05$), 其分布大致呈新月形; 在III至V层见少量的FLN, 第V层内的FLN细胞体较大(图1A); 对侧亦可见少量的FLN, 主要在中间部。诱痛后应用吗啡, 相应核团FLN数量明显减少, 与空白对照组相近(7.3 ± 2.5 , $P > 0.05$)。

2.2.2 三叉神经脊束核的其它亚核 牙髓炎诱痛后2h, 感觉主核(principal sensory nucleus)、口核(oralis)、极间核(interpolaris)(图1B)可见少量至中等量的FLN出现(见表1), 诱痛后使用吗啡能抑制这些核团的FLN的出现。

2.2.3 其它核团 牙髓炎诱痛后2h, 蓝斑(locus ceruleus)、孤束核(nucleus of solitary)、臂旁核(parabrachial nucleus, 图1C)、中脑导水管周围灰质(periphery gray of central canal)、室旁核(paraventricular nucleus)及大脑躯体感觉皮质(cerebral cortex, 图1D)等均可见中等量至大量的FLN(见表1), 以同侧为主, 诱痛后使用吗啡使明显抑制上述核团的FLN。

3 讨论

三叉神经系统的痛刺激从外周向中枢传导的过程经过第一级双极神经元, 第二级三叉神经感觉核簇, 第三级丘脑腹后区神经元后到达大脑皮质的

躯体感觉区^[6], 产生了痛觉。本研究发现, 在二级传导通路核团上, FLN主要出现在sp5c的第I、II层, 少量出现在第V层。Takemura等^[2, 7, 8]观察到痛传入神经纤维主要终止在尾侧亚核的I、II层; 尾侧亚核I、II层是痛感受神经元的分布区^[7, 8], 第III、IV层主要是非伤害性神经元的分布区, 提示尾侧亚核与头面部的初级传入尤其是痛(伤害性刺激)传入有密切联系。因此, 本实验结果对sp5c尤其是第II层在牙痛痛觉的传导和调节中所起的关键作用, 提供了形态学的证据。

本实验进一步观察到: FLN阳性颗粒主要密集分布在尾侧亚核, 而且极间核、口核和感觉主核同样可见到FLN的分布。以前的研究结果认为三叉神经脑干复合体中只有尾侧亚核参与了牙痛信息的中枢传导, 极间核、口核、感觉主核等其它的亚核并未在牙痛中起作用^[9]。本实验与既往的研究结果不同, 其原因可能是由于实验中采用的动物模型、刺激的类型及诱导的疼痛的强度不同所致。例如在实验过程中我们观察到大鼠对热刺激诱发的牙髓炎疼痛反应较为剧烈, 出现嘶叫、呼吸急促、烦躁等躯体反应, 这可能是因为本实验诱发的疼痛程度较强, 诱发了极间核、口核、感觉主核内的痛感受神经元的反应。据此, 我们认为除了尾侧亚核外, 三叉神经脊束核的其他亚核亦参与了牙痛信息的中枢传导和调节。

本研究还发现Fos蛋白在孤束核、蓝斑、臂旁核、室旁核、中央杏仁核、中脑导水管周围灰质等非特异性核团内也有表达。但实验中未能发现丘脑腹后内侧核核团内有FLN阳性颗粒的出现, 而在大脑皮质层躯体感觉区却有FLN的出现。这一结果与丘脑的腹后内侧核是三叉神经伤害性刺激向大脑皮质层投射的中继核的传统观点有差异^[8], 这提示传导痛觉的Fos样神经元由二级传入后可能并未中转于腹后内侧核, 而是通过其它的核团, 如臂旁核等投射到感觉皮层, 即可能通过c-fos以外的途径将痛觉传到最高中枢。

本实验的结果提示: 除了三叉神经脑干复合体外, 孤束核、蓝斑、臂旁核、室旁核、中央杏仁核等核团亦参与了牙髓炎疼痛的中枢传导及调控作用。这些核团的共同特点是: 它们是内脏活动的中继核团, 参与内脏的调节活动。结合神经解剖学研究结果, 可以认为三叉神经系统与内脏核团间形成的某些旁路, 参与了三叉神经系统的调节作用^[10]。

参考文献:

- [1] Hu J W. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls[J]. *Pain*, 1990, 41(3): 331.
- [2] Takemura M, Nagase Y, Yoshida A, *et al*. The central projections of the monkey tooth pulp afferent neurons [J]. *Somatosens Mot Res*, 1993, 10(2): 217.
- [3] Morgan J I, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun[J]. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14(1): 421.
- [4] Wallois F, Gros F, Masmoudi K, *et al*. C-Fos-like immunoreactivity in the cat brainstem evoked by sneeze-inducing air puff stimulation of the nasal mucosa[J]. *Brain Res*, 1995, 687(1~2): 143.
- [5] 林正梅, 凌均, 凌征宇, 等. 实验性牙髓炎疼痛动物模型的建立[J]. *广东牙病防治杂志*, 1999, 7(4): 249.

- [6] Marota J J, Crosby G, Uhl G R. Selective effects of pentobarbital and halothane on c-fos and jun-B gene expression in rat brain[J]. *Anesthesiology*, 1992, 77(2): 365.
- [7] Coimbra F, Coimbra A. Dental noxious input reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat as shown by c-fos expression upon thermal or mechanical stimulation[J]. *Neurosci Lett*, 1994, 173(1~2): 201.
- [8] Dong W K, Chudler E H, Kawakami Y. Tooth pulp-evoked potentials in the trigeminal brainstem nuclear complex[J]. *Brain Res*, 1990, 529(1~2): 131.
- [9] Allen G V, Barbrick B, Esser M J. Trigeminal parabrachial connections: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses[J]. *Brain Res*, 1996, 715(1~2): 125.
- [10] Bouhassira D, Villanueva L, Le Bars D. Effects of systemic morphine on diffuse noxious inhibitory controls: role of the periaqueductal grey[J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 216(2): 149.

(编辑 关淡庄)

(上接第252页)

体DNA小规模快速提取法,取得的染色体DNA达到了进行PCR扩增的纯度要求。随机扩增采用的引物长度为10个base,并应用经过优化的扩增条件,保证了能扩增出8至12个较为稳定、重复性较好的条带。经过多次重复实验,对*S. mutans* 10449、Ingbritt菌株染色体DNA均扩增出了相似的条带区,说明这些条带代表了变形链球菌中的保守区,利用这些保守区的信息,可将这些条带做为标准模式带用于变形链球菌的鉴定。标准模式带以外的条带,根据条带的有无、多少和位置可进行菌株的个体识别,而进行变形链球菌致病性的分子流行病学研究,如进行变形链球菌某菌株在母婴和家庭间传播的研究^[4]。本实验方法如果在临床分离株进行,可望确定某些条带与龋病的发生和患者DMFT数的关系进而利用这些特征条带进行变形链球菌毒力株确定。本研究表明AP-PCR技术做为分子生物学现代技术可望应用于龋病的微生物

分子流行病学、毒力株与非毒力株、基因分型的研究。

参考文献:

- [1] Loesche W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay [J]. *Microbiol Rev*, 1986, 50(1): 353.
- [2] de Soet J J, van Loveren C, Lammens A J, *et al*. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* [J]. *Caries Res*, 1991, 25(2): 116.
- [3] Menard C, Mouton C. Randomly amplified polymorphic DNA analysis confirms the biotyping scheme of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Res Microbiol*, 1993, 144(3): 445.
- [4] Li Y, Caufield P W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction finger printing for the genotypic identification of mutans streptococci from humans [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 1998, 13(1): 17.

(编辑 张敏瑞)