

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0183-04

大鼠实验性牙移动中配基门控阳离子通道 P2X₃受体在牙髓中的表达变化

卢云^{1,2} 杨秩³ 华小川⁴ 常新¹ 贵林¹ 王晟² 赖文莉²

(1.大连医科大学口腔医学院 正畸教研室, 大连 116044; 2.四川大学华西口腔医院 正畸科, 成都 610041;

3.上海交通大学医学院附属第九人民医院 正颌正畸联合治疗中心, 上海 200011;

4.云南省第二人民医院 口腔正畸科, 昆明 650021)

[摘要] 目的 探讨大鼠实验性牙移动过程中配基门控阳离子通道P2X₃受体在牙髓中表达变化, 初步了解P2X₃受体在正畸牙移动过程中的可能作用。方法 将54只雄性SD大鼠(体重200~250 g)随机分为空白组(5只)、对照组(14只)和实验组(35只)。选择左侧上颌第一磨牙作为观察对象, 获取不同时间点牙髓组织切片, 进行免疫组织化学研究。结果 正畸牙移动加力后, 牙髓中P2X₃受体免疫阳性表达增加, 并呈现一定的时间规律: 即受力后1/6 d逐渐增加, 3 d达到高峰, 7 d后下降至加力前水平。结论 正畸牙移动疼痛信息传递过程中P2X₃受体呈现有规律变化, 推测P2X₃受体与牙移动伤害表达密切相关, 但其作用机制还有待进一步研究。

[关键词] 实验性牙移动; 牙髓; 疼痛; P2X₃受体

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.021

Expression of ligand-gated cation channels P2X₃ receptor in rat pulp during experimental tooth movement
LU Yun^{1,2}, YANG Zhi³, HUA Xiao-chuan⁴, CHANG Xin¹, GUI Lin¹, WANG Sheng², LAI Wen-li². (1. Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Joint Orthodontics-Orthognathic Surgery Center, The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 4. Dept. of Orthodontics, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate ligand-gated cation channels P2X₃ receptors changes in rat pulp during experimental tooth movement(ETM), and preliminarily find their possible effect during ETM. **Methods** 54 male SD rats(200-250 g) were selected and randomly divided into blank group(5 rats), control group(14 rats) and experimental group(35 rats). The left maxillary first molar was selected as observation object, the pulp tissue biopsies was taken at different time points to carry out immunohistochemical study. **Results** Predominant up regulation of P2X₃ receptors immunoactivity was found in pulp from 1/6 d to 7 d after experimental tooth movement. It started to significantly increase at 1/6 d, peaked at 3 d, and then decreased continuously until 7 d as compared with the beginning. **Conclusion** P2X₃ receptors have a rhythm change in rat pulp as a result of ETM, speculated that P2X₃ receptors is closely related to the tooth movement injury, but the mechanism of action need further researches.

[Key words] experimental tooth movement; pulp; pain; P2X₃ receptor

研究证实三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是线粒体氧化磷酸化的产物, 是组织中伤害性刺激(包括疼痛)传导的重要神经递质。ATP与其配基门控阳离子通道P2X₃受体结合后传递疼痛信息。P2X₃受体是嘌呤受体P2X大家族的一员, 可特异地与C类传入纤维相连的神经元上表达^[1]。目前已有

较多的动物实验证明支持P2X₃受体介导伤害感受的理论, 其中通过对P2X₃受体基因敲除的大鼠实验已经比较明确了P2X₃受体在大鼠的外周疼痛传入中的主要作用^[2]。实验性牙移动可引起牙髓内神经纤维密度及分布的改变^[3], 目前国内外尚未见实验性牙移动后P2X₃受体在牙髓表达变化的研究报道, 本研究主要目的在于探索正畸牙移动加力后P2X₃受体在牙髓中的表达变化规律, 并与外周神经三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)和中枢神经三叉神经脊束核

[收稿日期] 2010-06-29; [修回日期] 2010-11-20

[作者简介] 卢云(1982—), 女, 河北人, 硕士

[通讯作者] 赖文莉, Tel: 028-85501442

尾侧亚核浅层(trigeminal subnucleus caudalis, TSC)进行比较,从而为研究P2X₃受体在正畸疼痛机制中的作用奠定坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

选用8周龄雄性SD大鼠54只,体重200~250 g(由四川大学华西动物中心提供),随机分组饲养在玻璃箱中,给予昼夜生物节律饲养。

分为空白组(5只)、对照组(14只)、实验组(35只)。对照组和实验组又各分为1/6、1/2、1、2、3、5、7 d共7组。

1.2 实验模型的建立和标本的制备

空白组的大鼠直接处死。其他组大鼠从腹部注射10%水合氯醛注射液(3 mL·kg⁻¹)。实验组大鼠在左侧上颌安放加力装置,将直径为0.25 mm的不锈钢结扎丝穿过大鼠左侧上颌第一磨牙与第二磨牙邻间隙后,将镍钛拉簧置于左侧上颌第一磨牙与同侧切牙之间,力值0.39 N,使磨牙产生近中倾斜移动,于各时间点处死各组大鼠。对照组大鼠进行与实验组相同的实验过程但不加力,处理后与实验组相同时间点处死。迅速取出处死大鼠左上颌第一磨牙的牙齿及其牙周组织,固定,漂洗,放入0.5 mol EDTA中脱钙1个月,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,沿大鼠第一磨牙远中腭根行纵向连续切片,5 μm厚,备做苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色之用。

1.3 SP免疫组织化学分析法

梯度脱水,用3%的过氧化氢溶液处理切片,0.01 mol PBS冲洗,0.1%胰酶修复,0.01 mol PBS冲洗,滴入亲和纯化的P2X₃兔抗鼠多克隆抗体(1:300)约50 μL于组织上,置于37℃湿盒中孵育60 min后于4℃冰箱过夜,0.01 mol PBS冲洗;加入第二抗体生物素化羊抗兔IgG(1:200)滴在组织上,37℃湿盒中孵育60 min;0.01 mol PBS冲洗,加入辣根酶标记白素三抗,37℃湿盒中孵育60 min;0.01 mol PBS冲洗,DAB染色。

1.4 图像分析

采用Olympus光学显微镜进行组织学观察和阳性表达统计。每只大鼠选1张切片,每张切片在左上颌第一磨牙牙髓选择3个区域,在高倍镜下(×400)进行分析,用尼康E600研究显微镜SPOT COD CCD摄像头进行图像采集,选用Image-Pro Plus计数P2X₃受体免疫阳性的光密度值,以3次测量值的均值作为该动物在该时间段的实测值。

1.5 统计学处理

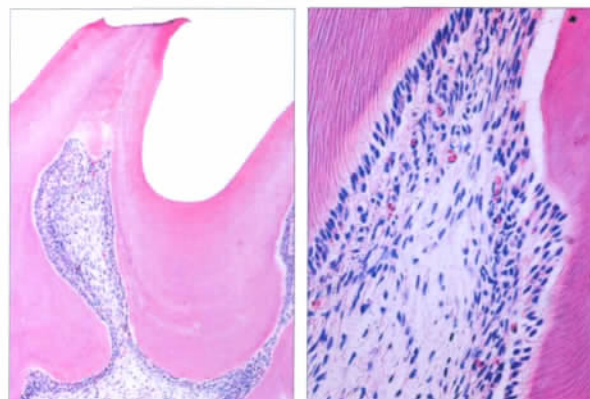
图像分析结果采用SPSS 13.0软件进行分析牙髓

中空白组、对照组及实验组之间的方差分析和两两比较,两两比较采用LSD法,比较3个组P2X₃受体表达是否有差异。

2 结果

2.1 正常大鼠牙髓的解剖结构

牙髓组织是由细胞、纤维和基质构成的一种疏松结缔组织,负担牙齿的营养、代谢、感觉和修复等功能,是牙体组织中唯一的软组织,正常大鼠牙髓的解剖结构见图1。



左: HE ×100; 右: HE ×400。

图1 大鼠牙髓形态

Fig 1 Morphous of rat pulp

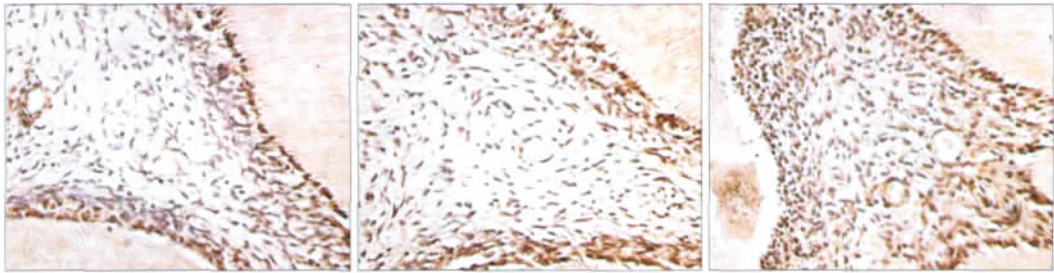
2.2 牙髓中P2X₃受体的表达变化

牙髓中P2X₃受体表达的免疫组织化学染色显示:P2X₃受体阳性表达为棕褐色,空白组及对照组大鼠牙髓组织中P2X₃受体表达弱阳性,主要位于成牙本质细胞层神经丛,伸向前期牙本质和牙本质,冠髓和根髓中均有表达(图2)。正畸加力后P2X₃受体表达显著增强,具体变化如下。

空白组、对照组及实验组3组方差分析,三者总体均有差别,采用LSD法进行两两比较。空白组与对照组比较P2X₃受体阳性表达差异均无统计学意义($P>0.05$),而实验组各时间点与空白组和对照组之间进行比较P2X₃受体阳性表达差异均有统计学意义($P<0.05$)。

对照组与实验组牙髓中各时间点P2X₃受体阳性表达平均光密度值见表1,2组相同时间点进行*t*检验分析,显示二者之间差异无统计学意义,表明实验中对大鼠的处理(麻醉、穿引结扎丝等)对实验结果并无影响($P>0.05$)。

不同组牙髓中P2X₃受体阳性表达变化见图3。在大鼠牙加力移动后的1/6 d至7 d,实验组P2X₃受体免疫阳性表达比对照组有明显升高,呈现短时上调变化并有一定时间规律:即受力后1/6 d逐渐增加,3 d达到高峰,7 d后下降至加力前水平。



左：空白组；中：对照组，3 d；右：实验组，3 d。
图 2 牙髓中P2X₃受体阳性表达比较 SP × 400

Fig 2 Comparison of P2X₃ receptor-positive expression in dental pulp SP × 400

表 1 不同组不同时间点牙髓中P2X₃受体染色光密度值

Tab 1 P2X₃ receptor staining optical density value at different experimental time in different groups

$\bar{x} \pm s$

时间/d	空白组	对照组	实验组
0	63 994.00±4 820.861		
1/6		85 955.50±4 434.267	115 214.75±16 382.637*
1/2		60 792.00±8 995.812	157 738.00±46 705.536*
1		74 791.50±7 592.615	182 315.75±13 041.310*
2		62 435.00±3 964.041	215 673.75±15 211.197*
3		73 194.00±8 677.614	262 182.00±66 521.402*
5		61 957.00±4 712.160	164 793.75±22 691.308*
7		60 963.00±11 853.938	127 969.50±16 675.129*

注：* $P<0.05$ 。

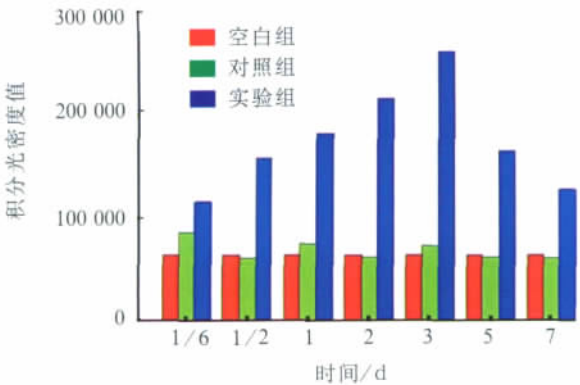


图 3 不同组牙髓中P2X₃受体阳性表达时间变化

Fig 3 P2X₃ receptor-positive expression in dental pulp at different experimental time in different groups

周神经。

在正畸力作用下，牙周膜、牙槽骨和牙龈等会发生组织相应变化，即使轻微的力量也将对神经有激惹并造成一定的神经损伤，从而导致患者出现疼痛不适等感觉异常。牙髓组织有丰富的神经支配，其感觉神经来源于三叉神经。Jiang等^[6]研究证实：大鼠磨牙在根髓和冠髓处均见P2X₃受体免疫阳性纤维存在，其形成成牙本质细胞下层神经丛，且伸向前期牙本质和牙本质。在人的第三磨牙牙髓内亦见P2X₃受体的存在和分布，在Raschkow成牙本质细胞丛下以及成牙本质细胞区的大部分纤维P2X₃呈免疫反应阳性^[7]，且人与大鼠P2X₃受体亚基有93%的同源性。本研究与以往研究结果类似，P2X₃受体免疫阳性纤维主要分布于成牙本质细胞层，冠髓和根髓中均有表达。

组织受损时导致ATP释放，与P2X₃受体结合后引起P2X₃受体阳性感觉神经元的去极化，从而激活了伤害感受器。本实验显示实验性牙移动过程中大鼠牙髓P2X₃受体免疫阳性表达呈现上调趋势，即实验组受力后1/6 d逐渐增加，实验后3 d时达到高峰，至7 d下降到加力前水平，提示牙移动时造成了一定的神经激惹，矫治力使牙齿一侧神经受压另一侧受牵张，激惹导致ATP的释放，激活伤害感受器，而P2X₃受体这个特殊的离子通道贯穿于神经元胞膜内

3 讨论

P2X₃受体是神经递质或神经调质ATP调控的配基门控阳离子通道，可独立或者联合在伤害感受器感觉神经节的中小直径神经元如背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)、TG及节状神经节(nodose ganglion, NG)中高表达，另外在交感神经节中亦有少量表达^[4]。P2X₃受体的这种显著的选择性表达提示它可能在ATP激活的伤害性感受活动中起传感器的作用^[5]。P2X₃受体不仅在初级传入神经元的胞体有功能性表达，而且这些受体能双向转运到中枢和外

外，当ATP在细胞外部与其结合时就开放，从而激活了牙髓部分未表达或表达较弱的细胞，P2X₃受体阳性表达增加。

本实验结果及以前的神经损伤的报道均发现：P2X₃受体的表达在1周或者2周后出现降低，这可能是局部组织已经逐渐适应外界刺激的缘故，也说明P2X₃受体的表达变化可随刺激而变化，是短时间的效应，不是一个持续的变化，也符合了牙移动的一过性疼痛规律，提示P2X₃受体在牙移动疼痛中的重要作用。在以往对人正畸牙移动疼痛的研究中发现^[8]：放置弓丝后4 h疼痛开始增加，并且在1/2 d已达到峰值，3 d后开始回落，7 d后基本恢复正常。这与本实验得出的P2X₃受体阳性表达变化的规律相似。因此推测，本实验动物模型在一定程度上模拟人正畸牙移动时伤害信息的传递过程，P2X₃受体可能在其中有着重要作用。

在课题组以往的研究中发现实验性正畸牙移动过程中，TG中P2X₃受体表达为一过性变化，呈现短时下调的规律，时间与正畸牙移动时的疼痛时间吻合，TSC加力侧的P2X₃受体表达变化也呈现短时下调的规律，其与外周的表达规律基本相同，本研究发现：在受力局部牙髓中P2X₃受体亦表现出类似的变化规律，因此推测P2X₃受体在受力局部、外周和中枢都与牙移动伤害表达及传递密切相关，但其作用机制还有待进一步探索^[9]。

本研究肯定了P2X₃受体在正畸牙移动疼痛中的重要作用，初步探索了P2X₃受体在牙髓中的表达变化，但是仅对表达进行了定性的分析，对于定量的统计及其表达的机制还有待进一步研究。在今后的研究中可以探索P2X₃受体在其拮抗剂作用下表达变化的规律以及与其他疼痛介质的相互作用^[10-11]，进而期待揭示P2X₃受体在正畸疼痛中的扮演的角色，寻找切实有效的缓解正畸疼痛的方法。

[参考文献]

[1] Yiangou Y, Facer P, Birch R, et al. P2X₃ receptor in injured

human sensory neurons[J]. Neuroreport, 2000, 11(5) 993-996.

[2] Souslova V, Cesare P, Ding Y, et al. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors[J]. Nature, 2000, 407(6807) :1015-1017.

[3] Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland S, Kvinnsland IH. Effect of experimental tooth movement on nerve fibres immunoreactive to calcitonin gene-related peptide, protein gene product 9.5, and blood vessel density and distribution in rats[J]. Eur J Orthod, 1997, 19(5) 517-529.

[4] Xiang Z, Bo X, Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia [J]. Neurosci Lett, 1998, 256(2) :105-108.

[5] Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, et al. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons[J]. Nature, 1997, 387(6632) 505-508.

[6] Jiang J, Gu J. Expression of adenosine triphosphate P2X₃ receptors in rat molar pulp and trigeminal ganglia[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002, 94(5) :622-666.

[7] Alavi AM, Dubyak GR, Burnstock G. Immunohistochemical evidence for ATP receptors in human dental pulp[J]. J Dent Res, 2001, 80(2) :476-483.

[8] 罗薇, 杨秩, 赖文莉. 视觉模拟评分法评价多个临床因素对正畸初始疼痛的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(6) :867-870.

LUO Wei, YANG Zhi, LAI Wen-li. Evaluating of clinical factors related to initial pain of orthodontic treatment by visual analogue scales(VAS)[J]. J Pract Stomatol, 2007, 23(6) :867-870.

[9] 曹阳, 赖文莉, 陈扬熙. 实验性牙移动中三叉神经节P2X₃受体蛋白量及mRNA的表达变化[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(5) 389-392.

CAO Yang, LAI Wen-li, CHEN Yang-xi. Differential regulation of P2X₃ protein expression in the rat trigeminal ganglion after experimental tooth movement[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(5) 389-392.

[10] Wu G, Whiteside GT, Lee G, et al. A-317491, a selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 504(1/2) :45-53.

[11] Taylor AM, Peleshok JC, Ribeiro-da-Silva A. Distribution of P2X(3)-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat[J]. J Comp Neurol, 2009, 514(6) :555-566.

(本文编辑 汤亚玲)

《国际口腔医学杂志》荣获教育部第3届中国高校特色科技期刊奖

为了促进高校科技期刊的发展和繁荣，总结办刊经验，全面提升高校科技期刊的竞争力和影响力，教育部于2010年11月组织了“第3届中国高校精品·优秀·特色科技期刊”评奖活动，评出特色科技期刊59种。由教育部主管、四川大学主办、四川大学华西口腔医学院承办的《国际口腔医学杂志》获得教育部第3届中国高校特色科技期刊奖。

《国际口腔医学杂志》编辑部