

犬牙周膜中神经纤维的形态特点及分析

曾晓华¹ 蔡巧玲¹ 宫苹²

1. 厦门大学附属第一医院口腔科, 厦门 361003;

2. 口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院种植科(四川大学), 成都 610041

[摘要] **目的** 通过免疫组织化学染色方法鉴定犬牙周膜中神经纤维的性质。**方法** 获取健康成年比格犬第二前磨牙近中至第三前磨牙远中牙槽骨颊舌侧下牙槽神经管上方的完整牙槽骨块, 制作硬组织切片后进行S100、神经丝蛋白(NFP)免疫组织化学染色, 显微镜下观察犬牙周膜中的神经分布。**结果** 犬牙周膜中分布的S100(+)组织呈以下几种形态: 密集环形组织聚成不同直径的束状结构; 条形纤维状伴行于管腔状结构; 游离末梢状或椭圆形片层状深染结构。NFP(+)组织分布特点与S100(+)相似, 但形态主要为不同直径条索状纤维结构, 呈束状、游离末梢状或分枝状散布于牙周膜胶原纤维束中。**结论** S100免疫组织化学结果可初步判断犬牙周膜中神经纤维的结构, NFP免疫组织化学结果可比较神经轴突的粗细区分神经类型, 从而有助于鉴定犬牙周膜中神经纤维的性质。

[关键词] 牙周膜; 神经纤维; 免疫组织化学

[中图分类号] R 78 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2016.05.005

Morphological features and analysis of the nerve fibers in the periodontal ligament of dogs Zeng Xiaohua¹, Cai Qiao-ling¹, Gong Ping². (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Dept. of Dental Implants, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (30772448; 81170995). Correspondence: Gong Ping, E-mail: dentistgong@hotmail.com.

[Abstract] **Objective** To identify the properties of nerve fibers of dogs by immunohistochemical staining method. **Methods** Intact bone blocks above the inferior alveolar nerve canal were cut from the medial of the second premolar to the distal of the third premolar of healthy adult Beagle dogs of 18 months, embedded to make hard tissue sections, stained with S100 and neurofilament protein (NFP) antibodies, and finally observed the nerve distribution under the microscope. **Results** The distribution of S100 positive tissue in the periodontal ligament of dogs showed the following patterns: bundles of densely gathered rings with different diameters, filaments accompanied by lumens, free endings and deep-dyeing oval lamellosome. The location of NFP positive tissue was similar to that of S100 positive tissue, but the distribution of these NFP positive filaments with various diameters showed largely as bundles, free ending and branches scattering in periodontal membrane. **Conclusion** We may firstly distinguish the structure of the nerve fibers in periodontal ligament of nerve distribution, and then judge the categories of the nerve fibers by S100 immunohistochemistry furtherly according to comparison of the thickness of neural axon by NFP immunohistochemistry, and finally distinct the function and attribute of the nerve fibers in the periodontal ligament of dogs.

[Key words] periodontal ligament; nerve fiber; immunohistochemistry

咀嚼系统是由咀嚼肌、颞下颌关节和咬合组成的受神经系统调控的功能整体, 其中牙周膜内分布

的神经组织负责将咬合产生的机械刺激传入中枢神经系统, 协调咀嚼运动^[1]。牙周膜中的传入纤维被认为是咀嚼系统感觉传入的一个重要组成部分, 其末端的感受器能感知和传递牙周膜内的刺激信号, 引起多种反射活动, 协调咀嚼系统的运动和功能。目前研究认为哺乳动物牙周膜内存在两种感受器:

[收稿日期] 2016-03-28; **[修回日期]** 2016-06-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30772448, 81170995)

[作者简介] 曾晓华, 主治医师, 博士, E-mail: zxhmm@126.com

[通信作者] 宫苹, 教授, 博士, E-mail: dentistgong@hotmail.com

力感受器和伤害性感受器,但未见明确对应的解剖形态学结构报道^[2]。这些感受器,可将牙齿受到的咀嚼力等刺激信号通过三叉神经的分支传入中枢神经系统,调节咀嚼肌的收缩活动。

分布于牙周组织中的神经组织可分为有髓神经纤维和无髓神经纤维,本研究将从组织形态学方面对犬天然牙牙周膜内神经纤维的分布和形态进行观察分析,并对应用免疫组织化学染色方法鉴定牙周膜中神经纤维性质的可行性进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

18月龄健康成年比格犬1只(四川大学华西医学实验动物中心提供),体重12 kg,实验前饲养1周。

1.2 获取、制作实验标本

1.2.1 获取标本 将犬以0.03 g·kg⁻¹戊巴比妥钠麻醉后,切取第二前磨牙近中至第三前磨牙远中牙槽骨颊舌侧下牙槽神经管上方的完整牙槽骨块,术中注意冷却,术后立即浸泡于4%中性多聚甲醛溶液中固定1周。

1.2.2 制作硬组织标本 将固定好的标本用流水冲洗,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明;依次用第1、2和3渗透液(第1渗透液:甲基丙烯酸甲酯75 mL,邻苯二甲酚二丁酯25 mL,二甲苯100 mL;第2渗透液:甲基丙烯酸甲酯75 mL,邻苯二甲酚二丁酯25 mL,过氧化苯甲酰1 g;第3渗透液:甲基丙烯酸甲酯75 mL,邻苯二甲酚二丁酯25 mL,过氧化苯甲酰2~5 g)分别渗透24 h。将配制好的包埋液(甲基丙烯酸甲酯75 mL,邻苯二甲酚二丁酯25 mL,过氧化苯甲酰5 g)充分搅拌后用滤纸过滤,移入容量为10 mL的圆柱状平底玻瓶中,将犬牙槽骨标本颊侧朝下放入瓶内浸泡,盖紧有孔瓶盖。放循环水,用真空泵抽真空4~6 h,37℃水浴过夜聚合。将包埋好的标本瓶砸碎取出包埋块。

1.3 硬组织切片的制备

用切割机粗修包埋块后,移至切片机上切成5 μm薄片,水浴60℃裱片,铬矾明胶贴片,置50~60℃烤箱中烘烤2~3 d后染色。用脱塑液在60℃烤箱中对切片进行脱塑2次,再转移到梯度乙醇去脱塑液后,水洗^[3]。

1.4 免疫组织化学染色

将脱塑后水化的切片,按常规石蜡切片免疫组织化学方法进行一抗为anti-S100抗体和anti-神经丝蛋白(neurofilament protein, NFP)抗体(Abcam公

司,美国)的免疫组织化学染色,显微镜下观察犬牙周膜中的神经分布。

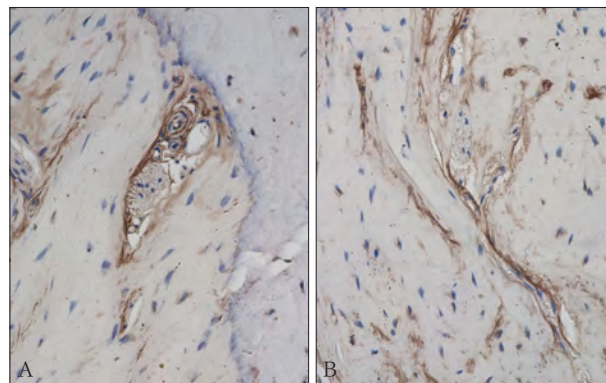
1.5 图片采集

染色后用Nikon Eclipse E600显微镜和与电脑连接的Nikon数码相机采图系统进行采图。

2 结果

2.1 S100免疫组织化学染色

光镜下,犬牙周膜中分布的S100(+)组织多数分布于牙根根尖段,偏近牙槽骨侧,主要呈以下几种形态:1)犬前磨牙牙周膜内可见明显的大小不等、排列略有差异的圆环状结构,圆环的中央为一圆点或小圆圈状结构,其外周的圆环内呈空泡或网格状结构,外缘有一颜色稍深的环形细线形成界限,另可见数个细胞核分布其间,形成密集环形组织组成束状结构,其形态特征与有髓神经纤维束状结构相似。2)S100(+)组织伴行于管腔状结构周围。3)S100(+)组织呈游离末梢状或特殊的椭圆形片层状深染结构。牙周膜中不同部位的S100(+)区域阳性表达强度不均匀(图1)。



A: S100(+)密集环形组织组成束状结构及S100(+)特殊的椭圆形片层状深染结构; B: S100(+)组织呈游离末梢状。

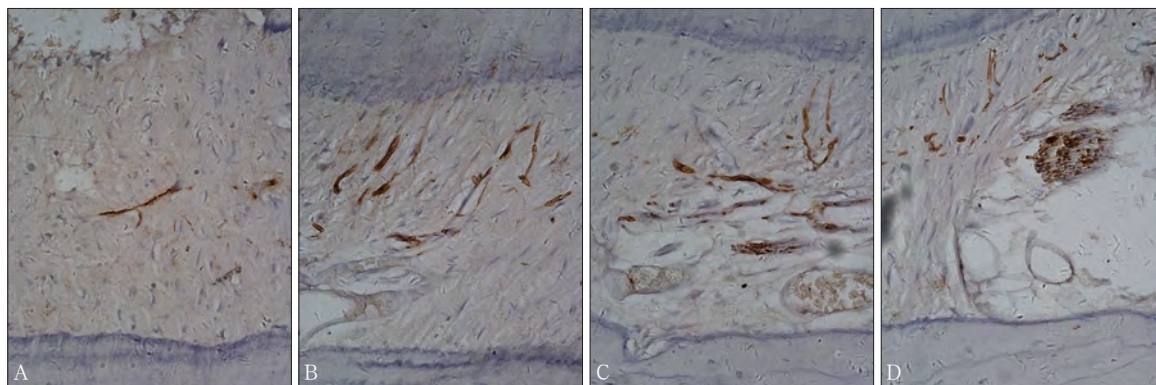
图1 犬牙周膜中S100(+)组织学分布 免疫组织化学染色
×400

Fig 1 The distribution of S100 positive tissue in the periodontal ligament of dogs immunohistochemistry staining ×400

2.2 NFP免疫组织化学染色

光镜下,犬天然牙牙周膜中分布的NFP(+)组织形态呈轴索状,着色较均匀一致。分布特点基本与S100免疫组织化学染色一致,多数分布于牙根根尖段,根中和根上段分布较少。组织学形态具有以下特点:不同直径的条索状纤维结构,呈束状、游离末梢状或分枝状散在分布于牙周膜胶原纤维束中。其中NFP(+)束状结构主要分布在血管腔周围,而游离末梢状结构主要穿插分布于牙周膜的胶

原纤维束中,游离末梢的直径大于束状结构中轴索的直径(图2)。



A: 犬牙周膜分布较细直径游离末梢状NFP(+)组织; B: 犬牙周膜分布较粗直径游离末梢状NFP(+)组织; C: 犬牙周膜分布纤细的NFP(+)组织组成的直径较小的束状结构; D: 犬牙周膜分布纤细的NFP(+)组织组成的直径较大的束状结构。

图2 犬牙周膜中NFP(+)组织学分布 免疫组织化学染色 ×200

Fig 2 The distribution of NFP positive tissue in the periodontal ligament of dogs immunohistochemistry staining ×200

3 讨论

牙周膜组织中存在的神经包括感觉神经和自主神经,其中自主神经的功能是支配血管收缩功能,牙周组织中的感觉神经才具备感受器功能^[4]。本实验观察发现,部分牙周膜中的神经符合有髓神经典型特征的束状结构,而另一部分呈S100反应阳性的椭圆形片层状深染结构以及NFP反应阳性的不同直径、结构特点的神经纤维。这些结构中既包括感觉神经也包括自主神经。Williams等^[5]研究认为,外周神经纤维根据传导速度的不同可分为三类。A类:有髓的躯体传入和传出纤维,依据其平均传导速度分为 α 、 β 、 γ 、 δ 四类,对应直径分别为13~22、8~13、4~8、1~4 μm ; B类:有髓的植物性神经的节前纤维,直径1~4 μm ; C类:无髓的躯体传入纤维 $\text{d}_\text{y}\text{C}$ 和植物性神经节后纤维 sC ,直径分别为0.3~1.3、0.4~1.2 μm 。牙周膜中的感觉神经包括A类和C类的传入纤维 $\text{d}_\text{y}\text{C}$;自主神经为C类的植物性神经节后纤维 sC 。

A类和C类神经纤维在结构上不同:A类为有髓神经,C类为无髓神经。本研究中S100免疫组织化学显示有髓神经的典型结构。因此,能从神经纤维的显微结构对A类和C类神经进行区别。对牙周膜中A类和C类纤维进行的研究^[6-8]表明,A δ 和C类纤维参与伤害感受,而A β 纤维具有机械感受功能,其细胞体分别位于三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)和中脑三叉神经核(mesencephalic trigeminal nucleus, MS)^[9]。

S-100蛋白的分子结构可由 α 和 β 两种亚基组成三种不同的形式,即S100ao(S-100 $\alpha\alpha$)、S100a(S-100 $\alpha\beta$)和S100b(S-100 $\beta\beta$)三种亚型,其中S100b

蛋白只存在于哺乳动物的中枢和周围神经系统及黑色素细胞中。免疫组织化学和免疫细胞化学的研究进一步发现,周围神经系统中S100b蛋白只存在于雪旺细胞,在其胞浆和胞膜中表达,轴索中缺乏S100b蛋白^[10]。有髓神经纤维中央的轴突不表达S100,因此有髓神经纤维免疫组织化学染色的横切面表现为大小不等的圆环状结构,内环中为直径不等的边缘深染的中空结构——轴突,深染的内环边缘为表达S100的雪旺细胞内缘胞质和胞膜;环内淡染的空泡状结构为髓鞘;髓鞘外缘是深染的细线,即雪旺细胞外缘的胞质和胞膜,构成神经纤维的界限。虽然包裹无髓神经轴突的雪旺细胞胞膜和胞浆也为S100(+),但由于其结构是由许多轴突自雪旺细胞胞膜表面内陷形成,因此神经纤维表面的胞质和胞膜成分均较少,且无髓神经纤维的直径较小,因此推断S100染色可能较浅。无髓神经纤维中雪旺细胞的胞核位于纤维的中央,无髓神经纤维的外周也有基膜,因此神经外周同样可见细长的成纤维细胞核分布于薄层结缔组织中,结构特征不典型。本研究观察发现,牙周膜中同一视野不同部位的S100(+)组织阳性表达强度存在差异,可能与不同的神经类型(有髓或无髓)有关。

有髓神经和无髓神经这两类神经纤维结构不同,S100免疫组织化学染色可作为区分二者的一种方法。由于神经周围突在接近终末端处髓鞘消失,有髓神经和无髓神经的末梢轴突均裸露成游离的末梢分布于终末组织中,S100免疫组织化学不能显示轴突,因此进一步判断神经类型具有局限性。

NFP是一种细胞骨架蛋白,广泛存在于动物的成熟神经元中,是神经丝的主要组成成分。外周感觉神经和运动神经对NFP具有稳定的免疫反应性,因

此NFP被认为是显示神经的一种可靠有效的方法^[1]。神经纤维中的轴突NFP免疫组织化学染色阳性,神经纤维的粗细与其轴突的直径正相关,轴突越粗包裹的髓鞘也越厚,形成的神经纤维的直径就越大。因此,NFP显示的轴突直径反映神经纤维的粗细。本研究显示NFP阳性组织分布与S100相似,但显示的形态结构与其不同,呈质地均匀一致的纤维状结构、直径大小不一的游离末梢状或分枝状。各类神经的差异主要体现在直径大小。本研究显示可根据S100染色初步判断神经的结构,再通过NFP染色比较神经轴突(即神经直径)的粗细,在显微镜下观察视野内选取同一神经纤维不同节段,通过测量其纵剖面宽度取均值,并参照不同类型神经纤维直径参数,从而进一步区分判断神经类型。

综上,本研究通过对牙周膜内神经纤维的免疫组织化学染色,从显微水平对牙周膜中神经纤维的类型进行初步的识别区分,为今后进一步深入的研究提供了显微水平的形态学基础。

[参考文献]

- [1] Maeda T, Ochi K, Nakakura-Ohshima K, et al. The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(3):307-327.
- [2] Maeda T, Ohshima H. Morphological basis on periodontal Ruffini endings[J]. Kaibogaku Zasshi, 1998, 73(2):119-134.
- [3] Hillmann G, Hillman B, Donath K. Enzyme, lectin and immunohistochemistry of plastic embedded undecalcified bone and other hard tissues for light microscopic investigations[J]. Biotech Histochem, 1991, 66(4):185-193.
- [4] Jacobs R, van Steenberghe D. Role of periodontal ligament receptors in the tactile function of teeth: a review[J]. J Periodont Res, 1994, 29(3):153-167.
- [5] Williams PL, Wendell-Smith CP. Some additional parametric variations between peripheral nerve fibre populations[J]. J Anat, 1971, 109(Pt 3):505-526.
- [6] Mengel MK, Jyväsjärvi E, Kniffki KD. Identification and characterization of afferent periodontal A delta fibres in the cat[J]. J Physiol(Lond), 1993, 464:393-405.
- [7] Mengel MK, Jyväsjärvi E, Kniffki KD. Identification and characterization of afferent periodontal C fibres in the cat[J]. Pain, 1992, 48(3):413-420.
- [8] Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, et al. Teeth and tooth nerves[J]. Prog Neurobiol, 1995, 45(3):165-222.
- [9] Millar BJ, Halata Z, Linden RW. A possible explanation for the response characteristics of multi-tooth periodontal ligament mechanoreceptors in the cat[J]. Anat Embryol, 1994, 190(5):445-452.
- [10] Gonzalez-Martinez T, Perez-Piñera P, Díaz-Esnal B, et al. S-100 proteins in the human peripheral nervous system[J]. Microsc Res Tech, 2003, 60(6):633-638.
- [11] Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins[J]. Arch Histol Cytol, 1989, 52(Suppl):13-24.

(本文编辑 李彩)

《实用口腔护理技术》出版发行

由北京大学口腔医院李秀娥和王春丽主编的《实用口腔护理技术》由人民卫生出版社正式出版发行。该书凝结了北京大学口腔医院、四川大学华西口腔医院、第四军医大学口腔医院、上海交通大学附属第九人民医院等10余家口腔医学院校护理专家的临床工作经验,内容全面、系统,通俗易懂。全书贯穿了四手操作的基本理念,采用图片和流程表的简要形式,从医生操作和护士配合两条主线出发,详细阐述了护理配合流程及要点。本书具有较强的可操作性和实用性,既可作为各院校培养口腔护理专业学生的教材,也可作为在职口腔护士的继续教育学习资料,对规范口腔临床的护理配合,指导口腔专科护理人员的临床操作具有重要的意义。