

[文章编号] 1000-1182(2007)06-0588-03

咬合创伤致咀嚼肌疼痛的中枢机制研究

俞燕芳¹, 谷志远¹, 傅开元²

(1.浙江大学口腔医院 正畸科, 浙江 杭州 310006;

2.北京大学口腔医院 颞下颌关节病口颌面疼痛中心, 北京 100081)

[摘要] 目的 观察咬合创伤后咬肌区的化学和机械伤害性刺激对中枢神经系统c-fos、P物质(SP)表达的影响。方法 在𪙇面洞型内放入一个2 mm牙用固位钉造成咬合干扰, 咬合创伤形成后7 d, 咬合创伤机械刺激组和机械刺激对照组在麻醉下对左侧咬肌区行机械性刺激, 记录有疼痛反应次数, 2 h后处死动物。咬合创伤化学刺激组和化学刺激对照组在麻醉下左侧咬肌区注射体积分数为5%甲醛, 2 h后处死动物。取大鼠脑干组织, 用SABC漂染法检测c-fos、SP表达, 并定量分析。结果 机械刺激和化学刺激后, c-fos在脑干obex水平和颈髓C₁₋₂水平有两个表达高峰, 咬合创伤机械刺激组和咬合创伤化学刺激组动物c-fos表达均明显高于其对照组($P<0.05$)。咬合创伤机械刺激组机械性刺激后脑干SP表达明显高于其对照组($P<0.05$), 在颈髓C₁₋₂水平SP表达咬合创伤机械刺激组比其对照组增高, 但无统计学差异($P=0.072$)。结论 咬合创伤可引起脑干和颈髓中枢神经元的敏化, 是咬合创伤致咀嚼肌疼痛的中枢机制之一。

[关键词] 咬合创伤; P物质; 中枢神经元敏化

[中图分类号] R782.6 [文献标识码] A

Central mechanisms of masticatory muscle pain induced by occlusal interference YU Yan-fang¹, GU Zhi-yuan¹, FU Kai-yuan². (1. Dept. of Orthodontics, Zhejiang University School of Stomatology, Hangzhou 310006, China; 2. Center for Temporomandibular Disorders and Orofacial Pain, School and Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China)

[Abstract] Objective To study c-fos and substance P expression in the central nervous system following mechanical and chemical nociceptive stimulation to the masseters in rats with occlusal interference. Methods Occlusal interference was made by bonding a 2 mm long dentin screw in the pulp cavity of the first maxillary molar in the left side. Seven days after occlusal interference, the rats in occlusal interference and mechanical stimulus group and mechanical stimulus control group were light anesthetized and nociceptive mechanical stimulus were applied to the ipsilateral masseter. Pain response was recorded and all the animals were killed 2 hours later. The rats in the other two groups were deep anesthetized and 100 μ L 5% formalin was injected into the ipsilateral masseter, killed 2 hours later. The brainstem and cervical spinal cord were processed c-fos and substance P immunoreactivity and data were quantitatively analyzed. Results Both mechanical and chemical stimulus to the ipsilateral masseter induced increasing neuronal c-fos expression in the trigeminal nucleus and in the cervical spinal dorsal horn in occlusal interference and mechanical stimulus group and occlusal interference and chemical stimulus group ($P<0.05$). Following mechanical stimulation to the ipsilateral masseter, substance P expression in the trigeminal nucleus transition zone was increased in occlusal interference and mechanical stimulus group ($P<0.05$). Conclusion The central neuronal sensitization in the brainstem may play an important role in the masticatory muscle pain induced by occlusal interference.

[Key words] occlusal interference; substance P; central sensitization

研究证实咬合创伤可引起咀嚼肌疼痛^[1-2], 但咬

合创伤引起咀嚼肌疼痛的机制尚不明。本课题组^[3]前期建立大鼠单侧高𪙇的咬合创伤动物模型, 发现𪙇创伤形成后第2天就开始出现高𪙇侧咬肌和颞肌痛觉敏感性增加。本研究对咬合创伤大鼠咬肌区施加机械和化学刺激, 检测疼痛初级传入中枢脑干和上部颈髓内c-fos和P物质(substance P, SP)表达, 探讨咬合创伤引起咀嚼肌疼痛的中枢机制。

[收稿日期] 2006-11-13; [修回日期] 2007-03-20

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 NCET-05-0021)

[作者简介] 俞燕芳(1979-), 女, 浙江人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 傅开元, Tel: 010-62179977-2323

1 材料和方法

1.1 咬合创伤动物模型的建立

将Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠16只分为咬合创伤机械刺激组、咬合创伤化学刺激组、机械刺激对照组和化学刺激对照组，每组4只，每只体重200~225 g，在22℃自然昼夜交替条件下自由进食。大鼠腹腔注射体积分数为10%的乌拉坦麻醉 (Sigma公司，美国)，左上颌第一磨牙颊面开髓、清理髓室、吹干，封金属失活剂，氧化锌丁香油糊剂暂封。1周后，在乌拉坦麻醉下，咬合创伤机械刺激组和咬合创伤化学刺激组大鼠左上颌第一磨牙颊面洞型内放入一长为2 mm的牙用固位钉 (高出颊面0.5~1.0 mm)，复合树脂粘接固定。机械刺激对照组和化学刺激对照组牙失活牙髓后不埋固位钉，树脂充填。

1.2 咬肌机械伤害性刺激的施加

咬合创伤形成后7 d，咬合创伤机械刺激组、机械刺激对照组大鼠腹腔注射体积分数为10%的乌拉坦浅麻醉下，用von Frey尼龙毛对左侧咬肌区行机械刺激，3次/min，间隔1 min，连续刺激1 h。如动物有抬后肢反应为疼痛反应，记录抬后肢反应次数，2 h后处死动物。

1.3 咬肌化学伤害性刺激的施加

咬合创伤形成后7 d，咬合创伤化学刺激组、化学刺激对照组大鼠全麻下于左侧咬肌区注射体积分数为5%甲醛100 μ L，2 h后处死动物。

1.4 SABC漂染法检测c-fos、SP表达

腹腔注射体积分数为10%的乌拉坦过量麻醉，浓度为0.1 mol/L磷酸盐缓冲液PBS (pH=7.4) 200 mL灌注后用体积分数为4%多聚甲醛固定液400 mL心内灌注，组织固定。取脑干及颈髓以obex为中心头向4 mm尾向8 mm共1.2 cm组织块，放入同一固定液中4℃条件下保存4 h，移至体积分数30%蔗糖液4℃过夜。固定好的组织块在-20℃作连续冰冻切片，厚度40 μ m。咬合创伤机械刺激组SABC漂染法检测c-fos (兔多克隆抗体1 500，Santa Cruze公司，美国)、SP (兔多克隆抗体1 2 000，Santa Cruze公司，美国)表达，咬合创伤化学刺激组只检测c-fos表达。

1.5 免疫组化定量分析和统计学处理

c-fos阳性神经元表现为细胞核呈棕黄色而胞浆不着色，染色阳性细胞可在显微镜下直接计数，obex水平上连续记录4层，C₁₋₂水平连续记录4层，取其平均值。SP阳性神经纤维分布区域染色呈棕黄色，SP免疫组化半定量分析，Nikon Eclipse E600显微镜连接CCD相机，用图像处理软件Pro Plus 4.1

进行SP免疫组化的图像分析。把得到的图像数字化并转化为8-bit的黑白图像，用最小的方形取景框在图像分析部位随机取5点，计算每点的矫正灰度值，并取平均值，成组t检验比较咬合创伤机械刺激组、咬合创伤化学刺激组、机械刺激对照组和化学刺激对照组间的差异。

2 结果

2.1 各组动物对机械刺激疼痛的反应

von Frey尼龙毛刺激左侧咬肌区，咬合创伤机械刺激组动物出现疼痛反应次数 (60.67 \pm 17.78)明显高于其对照组 (39.33 \pm 8.16) (t=3.215, P<0.05)。

2.2 脑干c-fos表达的定量比较

在脑干obex水平和颈髓C₁₋₂水平有两个c-fos表达高峰 (图1、2)。在咬肌区施予机械和化学刺激后2 h，咬合创伤机械性刺激组和咬合创伤化学性刺激组动物在obex水平和颈髓C₁₋₂水平刺激侧c-fos阳性神经元细胞计数均明显高于其对照组 (表1)。

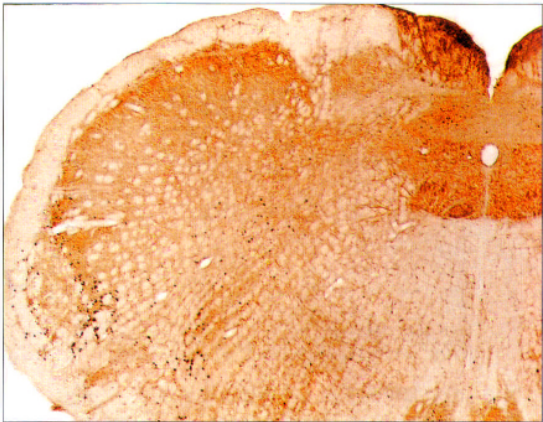


图1 脑干obex水平三叉神经脊束核的c-fos表达 SABC \times 10
Fig 1 c-fos expression in the trigeminal nucleus on obex level of brainstem SABC \times 10



图2 颈髓C₁₋₂水平脊髓背角c-fos阳性神经元分布 SABC \times 10
Fig 2 c-fos expression in spinal dorsal horn on 1-2 cervical spinal level SABC \times 10

2.3 脑干P物质表达的定量比较

SP在脑干obex水平分布在三叉神经脊束核的浅

层,在颈髓C₁₋₂水平分布于脊髓灰质背角的浅层 图3)。咬合创伤机械刺激组SP表达在三叉神经脊束核obex水平明显高于其对照组,在颈髓C₁₋₂水平比其对照组增高,但无统计学差异 P=0.072)。

表 1 咬肌区施予机械及化学刺激后在脑干obex及颈髓水平c- fos阳性神经元细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Neuronal c- fos expression on obex level of brainstem and cervical spinal level after giving mechanical and chemical stimulus ($\bar{x} \pm s$)

分组	机械刺激		化学刺激	
	obex水平	颈髓水平	obex水平	颈髓水平
刺激侧				
咬合创伤组	40.9 \pm 5.4	8.6 \pm 0.8	102.9 \pm 22.2	67.9 \pm 7.8
无咬合创伤对照组	12.8 \pm 4.8	4.3 \pm 1.0	35.4 \pm 5.3	46.9 \pm 5.4
非刺激侧				
咬合创伤组	23.1 \pm 5.3	0.8 \pm 0.1	48.2 \pm 14.7	6.5 \pm 1.8
无咬合创伤对照组	14.5 \pm 5.0	0.3 \pm 0.0	40.8 \pm 5.0	3.1 \pm 0.8



图 3 SP分布于脑干三叉神经脊束核的浅层 SABC $\times 10$
Fig 3 Substance P expression in the superficial level of brainstem trigeminal nucleus SABC $\times 10$

3 讨论

临床实验证实咬合创伤形成后几小时内即可出现咀嚼肌疼痛,Riise等^[1]对健康人右侧上颌第一磨牙人为造成0.5 mm高髙,3 h后大部分出现咀嚼肌的疼痛。本课题组^[3]以往的研究发现,大鼠单侧高髙形成咬合创伤后第2天就出现咬肌和颞肌的机械性痛觉敏感,并在2~3 d时达到高峰。咬合创伤后1周,清醒大鼠高髙侧咬肌机械性痛觉阈值基本恢复到对照组水平。咬肌区SP的表达半定量分析,咬合创伤形成后3 d,高髙侧咬肌区SP表达明显比对照侧高,咬合创伤形成后7 d,高髙侧增高的SP表达基本恢复到对照侧水平,显示外周神经末梢各种神经递质释放的增多是咬合创伤形成后出现急性咀嚼肌痛觉过敏的重要机制之一。本研究选择在咬合创伤形成后1周对高髙侧咬肌区施予机械和化学刺激,观察伤

害性刺激初级传入中枢脑干和上颈髓c- fos和SP的表达变化,此时外周神经末梢的敏化已经基本消失,选择这个时间点更有助单纯的分析咬合创伤引起慢性咀嚼肌疼痛的中枢机制。

c- fos表达的增加说明在特定的条件下神经元的活动发生了变化,神经兴奋迅速诱导c- fos表达^[4],因此c- fos蛋白可以作为伤害性刺激下神经细胞活动的标记物。SP属于速激肽家族,是哺乳类动物中枢神经系统中的重要神经递质,有研究^[5-7]显示外周组织损伤引起的持续性伤害性刺激可以引起痛觉过敏,而初级感觉神经元中枢突SP的释放是这种痛觉过敏的重要机制之一。

本研究发现,咬合创伤大鼠咬肌区在机械和化学刺激后有两个c- fos表达高峰部位,一个在obex水平,一个在颈髓的C₁₋₂水平,且髙创伤动物在这两个水平c- fos表达均明显高于其对照组,说明相同强度的外周刺激在咬合创伤大鼠引起了更多的中枢神经元兴奋,这个过程中哪些神经递质和神经递质受体的表达上调引起了这种中枢敏化是一个很复杂的过程。本研究在两个c- fos表达高峰区又对SP的表达进行了半定量分析,发现咬合创伤机械刺激组动物在obex水平SP表达明显比其对照组高,在颈髓C₁₋₂水平比其对照组高,但不明显 P=0.072),这与c- fos表达结果一致。说明SP表达的增高也许是咬合创伤动物的中枢神经元敏化的一个重要因素。

[参考文献]

[1] Riise C, Sheikholeslam A. The influence of experimental interfering occlusal contacts on the postural activity of the anterior temporal and masseter muscles in young adults[J]. J Oral Rehabil, 1982, 9 (5) :419- 425.

[2] Magnusson T, Enbom L. Signs and symptoms of mandibular dysfunction after introduction of experimental balancing-side interferences[J]. Acta Odontol Scand, 1984, 42 (3) :129- 135.

[3] Yu YF, Liu XD, Gu ZY, et al. Mechanical hyperalgesia of the masseter and the temporalis muscles induced by occlusal trauma in rat[J]. Chin J Dent Res, 2005, 8 (4) :17- 23.

[4] Kayser V, Guilbaud G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in rat [J]. Pain, 1987, 28 (1) :99- 107.

[5] Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, et al. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ[J]. Neuroscience, 1989, 30 (1) :241- 250.

[6] MacCarson KE, Goldstein BD. Release of substance P into the superficial dorsal horn following nociceptive activation of the hindpaw of the rat[J]. Brain Res, 1991, 568 (1/2) :109- 115.

[7] Yaksh TL, Jessell TM, Gamse R, et al. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo [J]. Nature, 1980, 286 (5769) :155- 157.

(本文编辑 汤亚玲)