

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)13-1156-04

## 实验性牙齿移动中 TG 内 P2X3 受体的表达变化

曹 阳<sup>1</sup> 赖文莉<sup>2</sup> 陈扬熙<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 中山大学光华口腔医学院正畸科 广东 广州 510055, <sup>2</sup> 四川大学华西口腔医学院正畸科 四川 成都 610041 )

### Change of P2X3 receptor expression in rat trigeminal ganglion during experimental tooth movement

CAO Yang<sup>1</sup>, LAI Wen-Li<sup>2</sup>, CHEN Yang-Xi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China, <sup>2</sup>Department of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the change of P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion sensory neurons after the nociceptive stimulation by orthodontic tooth movement force.

**METHODS:** Male Sprague-Dawley rats underwent the mimic orthodontic tooth movement. Immunohistochemistry and immunofluorescence were applied in studying the change of P2X3 receptor expression during experimental tooth movement. **RESULTS:** The proportion of P2X3 receptor-positive sensory neurons increased after giving force to the teeth of rats, to the peak 3 d later and returned to control values at 14 d. **CONCLUSION:** The P2X3 receptor expression is transiently upregulated and anterogradely transported in trigeminal primary sensory neurons in the process of orthodontic tooth movement. P2X3 receptor may play a role in the pathomechanism of nociceptive responses in primary sensory neurons during orthodontic clinic treatment.

**【Keywords】** tooth movement; trigeminal ganglion; ATP; P2X3 receptor

**【摘要】** 目的: 研究正畸牙移动中加力后 P2X3 受体在三叉神经节的表达变化规律, 以探讨 P2X3 受体在正畸牙移动疼痛机制中的作用。方法: 以雄性 SD 大鼠为实验对象, 模拟临床矫治的牙移动过程, 应用免疫组织化学手段进行研究。结果: 大鼠牙齿加力后, 观察到三叉神经节神经元 P2X3 受体免疫反应阳性率增高, 并呈现一定的时间规律。实验后 1 d 开始出现变化, 实验后 3 d 达高峰, 14 d 后下降至与对照组基本一致。结论: 大鼠牙移动过程中, 三叉神经节内(TG)的 P2X3 受体表达变化是一过性变化, 呈现短时下调的规律, 时间与正畸牙

移动疼痛时间一致。

【关键词】 正畸牙移动; 三叉神经节; ATP; P2X3 受体

【中图分类号】 R651.15 【文献标识码】 A

### 0 引言

正畸临床治疗是通过对错位的牙、牙弓或颌骨施加一定的矫治力来达到畸形矫治的目的, 伴随着很多机体的反应, 疼痛的产生是正畸治疗中最常见问题之一。研究发现三磷酸腺 ATP 及它的功能类似体在周围组织的炎症时使动物的疼痛行为加强<sup>[1]</sup>。因此 ATP 及其嘌呤类受体 P2X3 被认为在组织和神经受损害后扮演伤害感受信息的初级传入及传导的角色<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明 P2X3 受体参与伤害刺激的编码表达, P2X3 受体是 P2X 受体的一个亚单位, P2X 受体是 ATP 门控阳离子通道的一个家族<sup>[3]</sup>, 它与细胞外的 ATP 结合后被激活<sup>[4]</sup>, P2X3 受体基因是在 1995 年从感觉神经元 cDNA 文库中克隆出来的<sup>[3,5]</sup>, 被特异的定位于感觉神经节的中小径的神经元如背根神经节、三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)及节状神经节<sup>[3,5-6]</sup>, 当正畸加力使牙移动时, 由于牙周膜、牙槽骨和牙龈等会发生组织改建, 可以预料这些都对外周神经有激惹, 造成神经损伤, 可能使细胞内的 ATP 向细胞外流动通过三叉神经细胞的 P2X3 受体传导, 从而导致患者出现疼痛不适等感觉异常。本研究拟对正畸牙移动中加力后引起 P2X3 受体在三叉神经节的表达变化进行探索, 为进一步研究 P2X3 受体在正畸疼痛机制中的作用奠定基础。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用 8 wk 雄性 SD 大鼠(四川大学华西动物实验中心提供, 所有实验动物符合国际实验动物要求)共 84 只, 体质量 200~250 g, 在安静环境中饲养 48 h 以上。随机分为 3 组: 实验组(轻力(50 g)组及重力(100 g)组, 按时间段各有 7 小组, 每组 4 只。空白对照组按时间段分 7 小组, 每组 4 只。采用盐酸氯胺酮(0.4 mg/100g)肌注麻醉。将大鼠一侧上颌第一磨牙和前牙间用结扎丝拴正畸用 Ni-Ti 螺旋弹簧(0.008"×0.032")为防止弹簧脱落, 在前牙唇面及

收稿日期 2005-12-29; 接受日期 2006-03-19

基金项目 国家自然科学基金(30471912)

通讯作者: 曹 阳, 博士, 主治医师。Tel (020)83866394(O) Email:

Caoyang34@163.com

轴角处磨出深约 0.5~1.0 mm 槽沟,便于结扎丝结扎。测力计测力,建立轻力(50 g)及重力(100 g)正畸力作用下的牙移动模型。分别于加力后 4 h,1,2,3,5,7 和 14 d 定期处死。处死后迅速取实验组和对照组同侧三叉神经节、液氮速冻保存,冰冻连续切片,片厚 10  $\mu\text{m}$ 。吹干后零下 20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 大鼠的三叉神经节冰冻切片,常规 LsAB 法。第一抗体(Santa Cruz 生物技术公司,美国)为亲和纯化的 P2X3 羊多克隆抗体(1:100);免疫荧光第二抗体(vector 公司)为 FITC 标记兔抗山羊 IgG(1:100),加二抗前程序同常规 LsAB 法。阴性对照试验:①空白对照用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)取代一抗;②血清对照用正常羊血清取代一抗。

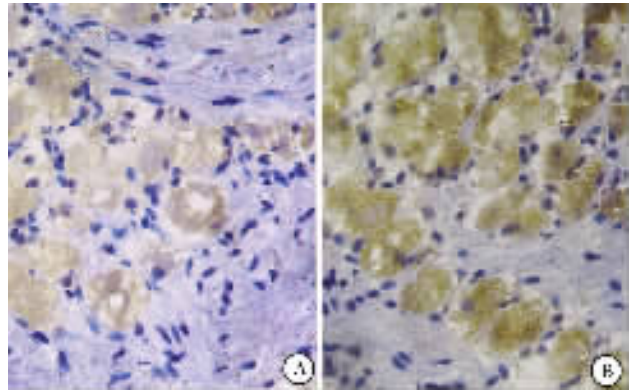
1.2.2 图像分析 各时间点的每只大鼠三叉神经节随机选取不相邻切片各三张,在明视野下计数免疫反应阳性神经元的总数量,计算其占节内神经元细胞总数的比例,得到每只大鼠的阳性神经元百分率,按每组 4 只大鼠,计算出平均百分率,并求得标准差。

统计学处理:资料用 SPSS 10.0 软件进行实验组与对照组之间单因素方差统计分析。

## 2 结果

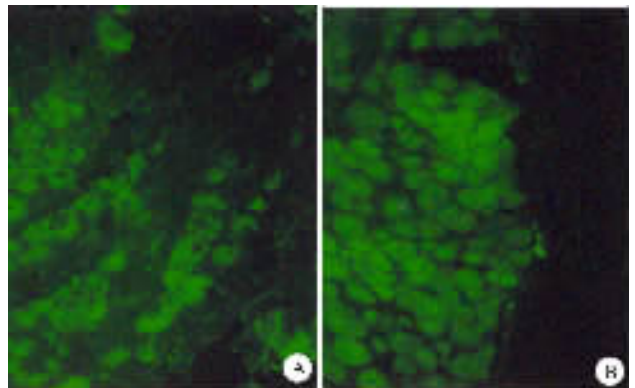
2.1 免疫组化染色 镜下观察表明 P2X3 受体抗体标记的棕黄色阳性胞体均匀分布于下颌支、上颌支及眼支的感觉神经元上,主要为中小型神经元,直径从 10~45  $\mu\text{m}$ ,部分大型神经元也有部分着色。DAB 染色标记在细胞膜及细胞浆里的。阳性胞体染色深浅不一,部分细胞核部位着色浅或不着色,周围胞浆点状着色,似菊花样。部分细胞胞浆内染色致密均匀,只在中心部位略淡。胞体染色深浅与胞体大小无关(图 1A、B)。

2.2 P2X3 受体变化情况 大鼠牙移动后,实验组 P2X3 免疫反应阳性在 TG 神经元中的表达明显上调并呈现出时程变化。与对照组相比,实验组 P2X3 免疫反应阳性神经元的数量在刺激后 4 h 即有微弱增加,至第 3 日达到高峰(图 1B,图 2B),此后逐渐减少,14 d 后 P2X3 受体神经元阳性率与对照组相似。而轻力组与重力组相比变化较小(表 1)。



A:对照;B:重力实验(3 d)。

图 1 大鼠三叉神经节神经元 P2X3 受体阳性表达 LsAB  $\times 400$



A:对照;B:重力实验(3 d)。

图 2 大鼠三叉神经节神经元 P2X3 受体阳性表达(免疫荧光) LsAB  $\times 200$

表 1 实验组和对照组不同实验时间 TG 内 P2X3 阳性神经元比率

( $n=4$ , %,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d	14 d
对照	47.33 $\pm$ 10.86	47.17 $\pm$ 10.21	47.83 $\pm$ 9.86	47.83 $\pm$ 10.38	43.83 $\pm$ 11.92	47.33 $\pm$ 11.31	48.00 $\pm$ 10.05
轻力实验	49.67 $\pm$ 10.48	52.33 $\pm$ 10.21	56.00 $\pm$ 9.59	59.67 $\pm$ 9.77 <sup>a</sup>	57.83 $\pm$ 9.87 <sup>a</sup>	52.67 $\pm$ 10.50	48.00 $\pm$ 12.52
重力实验	51.17 $\pm$ 12.62	56.00 $\pm$ 12.46	65.00 $\pm$ 13.54 <sup>b</sup>	72.00 $\pm$ 13.74 <sup>b</sup>	68.33 $\pm$ 13.46 <sup>b</sup>	53.83 $\pm$ 12.38	47.00 $\pm$ 11.87

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照。

2.3 免疫荧光结果 FITC 标记的神经元细胞呈现绿色荧光,主要标记在中小型细胞及部分大细胞,可

见重力组 3 d(图 2B)的 P2X3 阳性神经元的密度较正常对照组(图 2A)明显增加。

### 3 讨论

**3.1 ATP, P2X<sub>3</sub> 受体及三叉神经节** ATP 不仅存在于细胞内,也存在于细胞外。细胞内的 ATP 为细胞膜上的各种离子泵提供能量,而细胞外的 ATP 在神经、肌肉等组织中的信息传递中起一定的作用。ATP 从组织损伤的部位或一些病理状态的交感神经末端释放而作用于感觉神经末端的嘌呤受体已证实是引起疼痛开始的原因<sup>[7]</sup>。在神经损伤后 ATP 和 P2X<sub>3</sub> 嘌呤受体在感觉神经元的超敏性及向中枢神经系统 (CNS) 传递疼痛信息中有重要的角色<sup>[8]</sup>。已经有较多动物实验证明支持 P2X<sub>3</sub> 受体介导伤害感受的理论,特别是通过对 P2X<sub>3</sub> 基因敲除的大鼠的实验<sup>[9]</sup>,已经较明确了 P2X<sub>3</sub> 受体在大鼠的外周疼痛传入中的主要作用。

生理学研究表明头面部的伤害性信息是由三叉神经节中的中小径神经元传入的<sup>[10]</sup>,在正畸力作用下,牙周膜内出现张力区和压力区,即使使用轻微的力量,也能造成牙周组织的损伤,疼痛的刺激兴奋牙齿的外周伤害性感受器传导至初级感觉三叉神经节神经元后再传导至中枢神经。本研究结果显示 P2X<sub>3</sub> 受体主要呈现在三叉神经节小中径神经元上,与以前的报道相似<sup>[11-12]</sup>。P2X<sub>3</sub> 受体在初级感觉神经节的特异定位分布强烈提示其与牙移动中的伤害痛觉反应有密切的关系,同时也发现 P2X<sub>3</sub> 受体的免疫反应阳性在少部分三叉神经节的大神经元也有表达,提示 P2X<sub>3</sub> 除与痛觉有关,很可能还与正畸牙移动中的本体感觉有关,有待进一步研究。

**3.2 牙移动中 P2X<sub>3</sub> 受体在三叉神经节中的表达变化** 我们的实验显示在牙移动时 P2X<sub>3</sub> 生了上调的现象,提示牙移动时造成了一定的神经伤害,矫治力使牙齿一侧神经受压另一侧受牵张,损伤导致三磷酸腺苷 ATP 时释放出来,对伤害性感受器起激活作用,而 P2X<sub>3</sub> 这个特殊的离子通道贯穿于神经元胞膜内外,当 ATP 在细胞外部与其结合时就开放,从而激活了三叉神经节中部分未表达或表达较弱的细胞,使组织中的基因和蛋白表达的效率增加, P2X<sub>3</sub> 受体免疫反应上升可能是在受损后 P2X<sub>3</sub> 的合成增加为中枢神经末端提供新的受体而造成的结果,此外免疫组织化学研究结果显示轻力组的 P2X<sub>3</sub> 受体免疫反应弱于重力组,提示在正畸牙移动时,轻力造成的疼痛伤害较轻,对临床上提倡轻力矫治提供一个佐证,但合适的力值范围值得进一步研究。

本研究结果发现 P2X<sub>3</sub> 的表达在 1 wk 或 2 wk 后出现降低,这可能是局部组织已逐渐适应外界刺激的原因,也说明 P2X<sub>3</sub> 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,也暗合了牙移动的一过性疼痛规律,提示 P2X<sub>3</sub> 的表达在牙移动疼痛中的可能重要位置。最近的研究显示 P2X<sub>3</sub> 也许不是急性疼痛的主要介导<sup>[13]</sup>,而是主要在慢性炎症及神经病理性疼痛中表达<sup>[14]</sup>,结合本实验结果从疼痛类型提示了 P2X<sub>3</sub> 的表达变化在矫治力引起的慢性疼痛中的重要作用。

**3.3 牙移动中 P2X<sub>3</sub> 受体变化与其他痛觉模型中变化** 本实验结果与 Eriksson 等<sup>[12]</sup>报道在三叉神经的分支神经受损伤但神经元保持完整的情况下 P2X<sub>3</sub> 受体的表达是呈现瞬时的上调及持续增加的结果基本相一致。可以看出在神经损伤时如果神经元保持完整,则表达是呈现上调趋势,如果神经元受损,则出现下调趋势,而牙移动是由于牙周神经或牙髓神经受到损伤,是三叉神经感觉神经分支末梢受损,没有损伤到神经节的感觉神经元,神经元保持完整,故其中 P2X<sub>3</sub> 的表达呈现出上调的趋势。因而从一定意义上我们可以将牙移动模型看为一种局部神经损伤模型。

### 【参考文献】

- [1] Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126(1): 326-332.
- [2] Burnstock G. P2X receptors in sensory neurons [J]. *Br J Anaesth*, 2000, 84(4): 476-488.
- [3] Chen CC, Akopian AN, Sivilotti LA. P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons [J]. *Nature*, 1995, 377(6548): 428-431.
- [4] Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y Purinoceptors [J]? *Pharmacol Ther*, 1994, 64(3): 445-475.
- [5] Lewis C, Neidhart S, Holy C. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons [J]. *Nature*, 1995, 377(6548): 432-435.
- [6] 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.
- [7] Burnstock G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain [J]. *Lancet*, 1996, 347(9015): 1604-1605.
- [8] Driessen B, Reimann W, Selve N, et al. Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoceptor antagonists in rats [J]. *Brain Res*, 1994, 666(2): 182-188.
- [9] North RA. The P2X<sub>3</sub> subunit: a molecular target in pain therapeutics [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, 4(7): 833-840.
- [10] Azerak J, Woda A, Albe Fessard D. Physiological properties of neurons in different parts of the cat trigeminal sensory complex [J]. *Brain Res*, 1982, 246(1): 7.
- [11] Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, et al. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey

sensory neurons and their central terminals[ J ]. *Neuropharmacology* , 2000 36( 1997 ) 1229 - 1242.

[ 12 ] Eriksson J , Bongenhielm U , Kidd E et al. Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury[ J ]. *Neurosci Lett* , 1998 254( 1 ) 37 - 40.

[ 13 ] Jarvis MF , Burgard EC , McGaraughty S , et al. A-317491 , a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors , reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat[ J ]. *Proc Nat Acad Sci USA* , 2002 99( 26 ) 17179 - 17184.

[ 14 ] Honore P , Kage K , Mikusa J , et al. Analgesic profile of intrathecal P2X3 antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats[ J ]. *Pain* , 2002 99( 1-2 ) 11 - 19.

[ 15 ] Novakovic SD , Kassotakis LC , Oglesby IB , et al. Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury[ J ]. *Pain* , 1999 80( 1-2 ) : 273 - 282.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790( 2006 )13-1159-01

## 神经症患者 TCD 检查分析

黄河,徐丽英

(温州医学院附属第一医院神经内科,浙江温州 325000)

【关键词】神经症;TCD;脑血流

【中图分类号】R749.7, R445.1 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-01/2003-12 神经症患者 57(男 33,女 24)例,年龄 18~62(平均 37.8±10.8)岁,均符合 CCMD-3 诊断

标准,病程 0.5~17 a,其中焦虑症 18 例,恐惧症 3 例,强迫症 5 例,躯体形式障碍 6 例,神经衰弱 17 例,其他神经症 8 例。对照组为同期体检正常健康人 40 例,男 17 例,女 23 例,年龄 20~63(平均 39.5±10.5)岁。于安静状态下行 TCD 检查,采用德国 DWL 公司生产 Multi Dop L2 型 TCD 仪,由专职医师操作,用 2 MHz 探头对患者颅内主要动脉进行检测,包括大脑前、中、后动脉(ACA, MCA, PCA)及椎-基底动脉(VA, BA),记录收缩期峰流速  $V_s$ ,平均流速  $V_m$ ,舒张期末流速  $V_d$ 。两组大脑中、前、后动脉及椎动脉的左右两侧流速均无差异( $P > 0.05$ )。神经症组(A组)与对照组(B组)比较,大脑中、前动脉、椎-基底动脉流速均高于对照组(表 1)。

表 1 神经症患者收缩期峰流速( $V_s$ ),平均流速( $V_m$ ),舒张期末流速( $V_d$ ) (cm/s,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MCA		ACA		PCA		VA		BA
		L	R	L	R	L	R	L	R	
A( $V_s$ )	57	103.1±6.6 <sup>b</sup>	100.31±3.5 <sup>b</sup>	88.7±14.4 <sup>b</sup>	87.2±13.0 <sup>b</sup>	55.7±5.2	55.8±5.1	66.9±10.8 <sup>b</sup>	66.2±11.0 <sup>b</sup>	74.2±13.4 <sup>b</sup>
B( $V_s$ )	40	90.7±7.2	90.5±7.9	77.3±8.2	78.0±6.6	54.3±4.3	54.6±4.1	56.3±7.4	56.0±7.1	64.6±7.6
A( $V_m$ )	57	71.7±12.3 <sup>b</sup>	69.8±10.3 <sup>b</sup>	62.7±10.7 <sup>b</sup>	61.7±9.4 <sup>b</sup>	39.4±4.4	39.2±4.0	48.5±8.9 <sup>b</sup>	48.2±8.7 <sup>b</sup>	53.8±10.5 <sup>b</sup>
B( $V_m$ )	40	62.7±5.4	63.0±6.5	54.4±6.4	55.3±5.5	38.3±3.9	38.7±3.7	40.7±5.9	40.4±5.3	45.7±5.5
A( $V_d$ )	57	46.3±8.2 <sup>b</sup>	44.7±7.5 <sup>b</sup>	40.3±7.7 <sup>b</sup>	39.5±5.8 <sup>b</sup>	24.3±3.3	24.3±3.0	31.6±6.4 <sup>b</sup>	31.2±6.5 <sup>b</sup>	35.4±7.5 <sup>b</sup>
B( $V_d$ )	40	39.7±4.0	39.8±4.5	35.4±3.6	35.7±3.4	23.9±2.7	23.9±2.8	26.1±4.0	26.2±3.6	30.2±3.9

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs B.

2 讨论 神经症病因与发病机制复杂,症状表现繁多,明显影响患者身心健康、社会功能与职业功能<sup>[1-2]</sup>。我们发现,神经症组颅内诸多动脉流速明显高于对照组,有统计学意义,与文献报道相似<sup>[3]</sup>。提示神经症患者存在颅内动脉血流动力学异常的客观依据。脑血流的改变可能由于神经症者大脑功能失调、植物神经功能紊乱所致,确切机制有待明确。

收稿日期 2005-10-30; 接受日期 2005-11-23

作者简介 黄河,医师, Tel (0577)88069275 Email kesui@tom.com

### 【参考文献】

[ 1 ] 黄永新. 神经症患者人格与心理症状相关性研究[ J ]. *中国临床心理学杂志* 2001 9( 2 ) 126 - 127.

[ 2 ] 高成阁, 陈策, 王赞利, 等. 神经症患者人格特征及人格障碍倾向[ J ]. *第四军医大学学报* 2005 26( 1 ) 71 - 74.

[ 3 ] 栾玲, 曾令均, 张亚哲. 经颅多普勒观测抑郁症及神经症患者脑血流的研究[ J ]. *中国神经精神疾病杂志* 2004 30( 4 ) 300 - 301.

编辑 潘伯荣