

# Fos 蛋白参与牙髓炎疼痛中枢调控作用的实验研究

林正梅 程 斌 凌均葵 陈小华 刘建伟

**摘要** 目的:研究大鼠实验性牙髓炎疼痛诱导 Fos 蛋白表达与其靶基因脑啡肽前体 mRNA 转录、脑啡肽水平改变之间的关系,探讨牙痛的中枢调节机制。方法:应用免疫组化方法观察 Fos 蛋白在三叉神经脊束核尾侧亚核(sp5c)内的表达、原位杂交技术检测 PENK mRNA 的转录和放射免疫技术测定 sp5c 内 ENK 含量的变化。结果:实验性牙髓炎疼痛诱导 Fos 蛋白在 sp5c 内的表达呈时间依赖性,Fos 蛋白在诱痛后 0.5h 表达,2h 达高峰,4h 后渐减弱;PENK mRNA 在牙痛后 2h 始转录,4h 达高峰,8h 后渐减弱。牙髓炎诱痛后 4h sp5c 内 ENK 含量显著升高( $P < 0.01$ )。结论:Fos 蛋白通过激活靶基因脑啡肽前体基因的转录,引起中枢内脑啡肽水平的升高而参与牙痛的中枢调节。  
**关键词** 牙痛 调节 Fos 蛋白 脑啡肽前体基因 脑啡肽

## The Role of Fos Protein in Modulation of Dental Pain in Central Nerve System

Lin Zhengmei, Cheng Bin, Ling Junqi, et al

Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective**: The aims of this study were to reveal the relationship between Fos protein expression, the transcription of preproenkephalin (PENK) mRNA, and the change of enkephalin (ENK) level initiated by experimental dental pain, and to understand the central modulation mechanism of dental pain. **Methods**: The techniques of immunohistochemistry in situ hybridization and radioimmunoassay were applied respectively to detect the expression of Fos, the transcription of PENK mRNA, and the change of ENK level in the experimental nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve, caudal part (sp5c) of rats. **Results**: It was found that Fos protein expression was in a time-dependant manner. Fos appeared half hour after the pain stimulation, and its peak occurred two hours after the pain stimulation, but disappeared slowly four hours later. The transcription of PENK mRNA was seen two hours after the pain stimulation, its peak appeared four hours later and it disappeared eight hours later. The level of ENK increased significantly ( $P < 0.01$ ) in the caudal part of the spinal tract of the trigeminal nerve four hours after pain stimulation. **Conclusion**: Fos protein may take a part in the central modulation of dental pain by initiating PENK mRNA transcription which led to the increment of ENK.

**Key words**: dental pain modulation Fos protein preproenkephalin enkephalin

牙髓炎疼痛(牙痛)是一个非常复杂的病理生理过程,其中枢调节机制尚未明确,尤其有关牙痛信息在中枢的传导和调节机制尚不清楚。本研究旨在观察实验性牙痛诱导“核内第三信使”Fos 蛋白<sup>1,2</sup>表达与其靶基因脑啡肽前体 mRNA (preproen-

kephalin mRNA, PENK mRNA) 转录、脑啡肽(enkephalin, ENK)水平改变之间的关系,以了解 Fos 蛋白在牙髓炎疼痛信号中枢传导及调控中的可能作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

94 只 Sprague-Dawley 大白鼠(中山医科大学实验动物中心提供),体重 200 ~ 250 g,鼠龄 5 ~ 6 个月,口腔卫生良好,无龋齿及牙周病。

#### 1.2 牙髓炎诱痛动物模型的建立

本课题为中山医科大学科研基金资助项目(编号 96015)

作者单位: 510055 中山医科大学口腔医学院附属光华口腔医院口腔内科

牙髓炎诱痛动物模型建立的主要方法为:在局麻下消毒实验动物,将上切牙开髓,生理盐水冲洗、吸干,将浸有细菌内毒素的纸尖置入髓腔,暂封,24 h后病理及临床表现为典型的浆液性牙髓炎<sup>3</sup>。

1.3 实验分组

将94只大白鼠随机分成2组:A组(空白对照组)29只,在安静环境下饲养24 h;B组(牙髓炎疼痛组)65只,全部建立牙髓炎诱痛模型,其中45只大鼠再随机分为5组,每组9只,分别在诱痛后存活0.5h、1h、2h、4h、8h。余下的20只存活4h。

1.4 Fos蛋白的检测

A组9只(在安静状态下饲养24 h)、B组45只大鼠分别存活至预定时间后,麻醉下心脏灌注固定、断头、大鼠脑立体定位仪确定三叉神经脊束核尾侧亚核(nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve,caudal part,sp5c)、取块、恒冷切片,LSAB法及硫酸镍铵加强染色法(GDN)进行漂染。漂染步骤简述如下:切片在1ml正常羊血清(含3μl Triton X-100)4下孵育0.5h;转入稀释度为1:1000的Fos蛋白单抗溶液(Santa Cruz公司)4下孵育24h;转入二抗溶液,4下孵育24h;转入三抗溶液,室温下轻摇2h;DAB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。Fos蛋白表达的测算: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(×40)在一个核团内随机选择5个视野,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 PENK mRNA的检测

上述A、B组各三叉神经脊束核尾侧亚核的sp5c冰冻切片,用5'端生物素标记的寡核苷酸探针行原位杂交,反义探针序列为:5'-XCCTGGCCAACCTCCTCCGACCTCCTGAAA GAGC-3',原义探针序列为:5'-XGCTCTTTCAGCAGGTCGG AGGAGTTGGCCAAGG-3'(上海生物技术工程公司)。步骤简述如下:4%多聚甲醛前固定;0.3% Triton X-100/PBS处理;37℃蛋白酶K(10μg/ml)消化;4%多聚甲醛后固定;42℃预杂交1h(预杂交液内含去离子甲酰胺,20×SSC,50×Denhardt液,变性鲑精DNA,酵母tRNA,DEPT-H<sub>2</sub>O液);42℃杂交12h(杂交液中含生物素标记的反义探针16.5μg/ml);37℃湿盒内酶标 Streptavidin 0.5h;DAB显色,苏木素复染;常规脱水、透明、封片。实验中设空白对照(杂交时不加标记反义探针)和阴性对照(杂交液为标记原义探针)。PENK mRNA转录程度的测量:核团内神经元胞浆呈棕黄色染色者为阳性颗粒,其计数方法同Fos蛋白。

1.6 ENK含量的测定

A、B组各剩余的20只大鼠存活至预定时间后(A组24 h,B组4 h)处死,断头,取尾侧亚核,用脑啡肽放射免疫测定试剂盒(北京海科生物技术中心)检测ENK含量,步骤简

述如下:尾侧亚核称重,置于1ml 100%生理盐水中隔水煮沸,制成匀浆,低温离心,测上清液中ENK含量。

1.7 统计分析

应用SAS软件进行计量资料的q检验(Newman-keuls法)。

2 结果

2.1 Fos蛋白检测结果

正常对照组sp5c内未见或仅见少量Fos免疫阳性反应(Fos-like immunoreactivity neuron,FLN)的表达(图1);在牙髓炎症情况下施予反复热刺激,FLN在sp5c内表达的数量呈时间依赖性(表1),诱痛后0.5h FLN的数量开始增多(图2);2h FLN的数量达到高峰,sp5c的I、层背腹侧和中间部分可见较为密集的FLN的分布,大致呈新月形,在Ⅱ~V层见少量的FLN分布(图3);4h后FLN的数量开始减少,直至8h FLN数量又基本恢复至未刺激时的状态。



图1 空白对照组的尾侧亚核内未见FLN的阳性表达 LSAB + GDN ×200



图2 牙髓炎诱痛后0.5h尾侧亚核内见少量的FLN的阳性表达(胞核呈棕染) LSAB + GDN ×200

2.2 PENK mRNA检测结果

正常对照组、空白对照组和阴性对照组sp5c内未见有杂交信号的出现,诱痛后1~2h,核内见少量阳性颗粒出现,4h后PENK mRNA的转录达到高峰,8h后逐渐减弱。阳性颗粒亦主要位于sp5c的

第 II 层(图 4),其余层非常少见。从表 1 和图 5 还可见,c-fos 的表达先于 PENKmRNA 的转录,两者的

强弱趋势基本一致(弱 强 弱),表明两者间的密切关系。

表 1 尾侧亚核、层 Fos 蛋白和 PENKmRNA 转录的阳性颗粒计数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	A 组	B 组				
		0.5h	1h	2h	4h	8h
Fos 蛋白	5.44 ±2.78	25.30 ±6.21 *	65.00 ±5.82	72.30 ±6.24 *	10.37 ±5.23	4.34 ±1.27
PENK mRNA	-	-	6.38 ±3.24	8.35 ±4.70	30.54 ±2.75 *	7.26 ±4.70

\* 表示与 A 组相比  $P < 0.01$



图 3 牙髓炎诱痛后 2 h,尾侧亚核内见多量的 HLN 的阳性表达(胞核呈黑染) LSAB + GDN ×200



图 4 牙髓炎诱痛后 4 h,尾侧亚核内见 PENKmRNA 的转录(胞浆呈棕黄色染色) ISH ×200

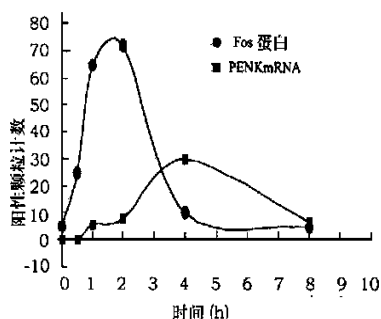


图 5 Fos 蛋白表达与 PENKmRNA 转录随时间变化的关系图

### 2.3 ENK 含量检测结果

A 组的 ENK 水平为  $12.65 \pm 3.19 \mu\text{g/ml}$ , B 组的 ENK 的含量为  $133.11 \pm 5.14 \mu\text{g/ml}$ , 即牙髓炎诱痛后脑内 ENK 含量明显增高 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨 论

三叉神经系统的痛刺激从外周向中枢传导的

过程中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<sup>4</sup>,产生痛觉。本实验结果发现:在三叉神经传导通路核团上,Fos 样阳性神经元主要位于 sp5c 的第、层,表明 sp5c、层是二级传导通路中的重要结构。神经解剖学和电生理学的研究均表明 sp5c 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<sup>5,6</sup>,并且痛传入神经纤维主要终止在 sp5c 的、层,少部分在 V 层;sp5c、层是痛感受神经元的分布区<sup>5,6</sup>,而在第、层主要是非伤害性神经元的分布区。因此,可以认为 sp5c 尤其是第层是牙痛痛觉传导和调节的关键部位所在。

本研究结果显示:牙髓炎诱痛后 1~2h,sp5c 内 PENK 基因被诱导激活,PENK mRNA 的转录在诱痛后 4h 达到高峰,从图 4 可看出,PENK 基因的转录尾随在 c-fos 基因的表达之后,两者的强弱趋势基本相似,该结果目前作者尚未见报道。近期研究提示<sup>2,7,8</sup>,Fos 蛋白与 Jun 蛋白形成异构二聚体,与阿片肽基因 5 端 CRE-2 位点结合调节阿片肽基因的表达。PENK 基因是阿片肽基因家族的主要成员之一,Wu 等<sup>9</sup>报道了口腔颌面部疼痛与 PENK 的关系,其结果与本研究结果类似。根据 Fos 蛋白与 PENK mRNA 出现的时相关性和强弱趋势推测:Fos 蛋白与脑啡肽前体基因有密切的关系,牙痛可能通过诱导 Fos 蛋白的表达激活 PENK mRNA 的转录。

神经肽前体大分子经内肽酶酶切成为 ENK 等参与痛觉调节的生物活性因子。本研究进一步发现:在牙齿未施予任何刺激时,ENK 的含量均处于较低的水平,一旦诱导牙髓炎疼痛发作时,ENK 的水平明显增加 ( $P < 0.01$ )。Shibutani 等<sup>10,11</sup>的研究发现,电刺激下前牙能引起 sp5c 内 P 物质、ENK 明显增高,并认为 ENK 可能在脊髓水平通过对 P 物质能传入纤维的突触前抑制作用而抑制痛觉传入;

(下转第 259 页)

一致。注射鱼肝油酸钠后,早期的确有局部血管内血流淤滞发生,但根据本实验电镜观察结果发现,鱼肝油酸钠对内皮细胞有极强的杀伤作用,早期即可引起内皮细胞的坏死脱落,因其造成的内皮下胶原暴露而引发凝血系统作用,应为血栓形成的主要原因。

根据文献及本实验的结果,作者认为:各类硬化治疗药物对血管的硬化作用机理基本一致,都表现为初期内皮细胞及内皮下组织损伤,血栓形成,后期血栓机化,血管壁增厚,致管腔闭塞。血管周无菌性炎症可促血栓机化的完成,而管周、管壁组织的广泛坏死(如鱼肝油酸钠组)则导致血栓机化无法进行。Powell等<sup>7</sup>报道,在正常的血管壁结构中,内皮细胞可通过产生并释放肝素样物质而有效地抑制血管平滑肌的增殖。内皮细胞受损后由于血小板粘附和白细胞浸润,失去了对血管平滑肌细胞增生的抑制作用<sup>8</sup>。因此,平滑肌细胞在内皮细胞受损时,可经过迁移、分化和增生而取代损伤的内皮细胞并引起内膜的增生<sup>7~9</sup>。景在平<sup>8</sup>认为内皮细胞损伤而导致的血管平滑肌细胞增殖是血管壁增生,管腔变窄的主要原因。本实验中各实验组(鱼肝油酸钠除外),在增生的内膜及机化组份

中,均发现有平滑肌细胞的参与。因此可以认为,在血管硬化的过程中,平滑肌细胞参与并协助完成了血管壁增厚、血管闭塞的过程。

### 参考文献

- 1 Blenkinsopp WK. Choice of sclerosant. *Angiology*, 1970, 7(4): 182 ~ 184
- 2 赵吉虹,赵怡芳,陈新明,等. 平阳霉素与鱼肝油酸钠对血管硬化作用的比较研究. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(2): 97 ~ 98
- 3 郑麟蕃主编. 实用口腔科学. 北京:人民卫生出版社, 1993: 310
- 4 Flokman J. Angiogenesis inhibitor. *Science*, 1983, 221(2): 719 ~ 725
- 5 Beck J. Action of adrenal cortical steroid on endothelial cells. *Am J Physiol*, 1981, 165(2): 456 ~ 469
- 6 Ingber DE. The influence of the odrenal cortex on behavior of termial vascular bed. *Endocrinology*, 1986, 119(3): 1768 ~ 1775
- 7 Powell RJ, Carruth K. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth uscle cell migration. *J Vasc Surg*, 1996, 24(3): 51 ~ 53
- 8 景在平. 血管内膜增生的研究. *中华实验外科杂志*, 1997, 14(3): 259 ~ 260
- 9 Nelson PR, Yamamura S. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg*, 1996, 24(1): 25 ~ 29

(1998-08-20 收稿, 2001-06-10 修回)

(本文编辑 刘 怡)

(上接第 255 页)

也可能阻断 K<sup>+</sup>引起的去甲肾上腺素的释放,即通过间接调节其它神经递质而发挥其痛觉调节的作用。因此,可以认为 ENK 参与了牙髓炎疼痛的中枢调节作用。本研究发现牙髓炎疼痛通过诱导 Fos 蛋白表达,激活 PENKmRNA 的转录、调节 ENK 的合成参与牙痛的中枢调控作用。

### 参考文献

- 1 Morgan JJ, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci*, 1991, 14(1): 421 ~ 451
- 2 Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early gene in the nervous system. *Neuron*, 1990, 4(2): 477 ~ 485
- 3 林正梅,凌均棠,凌征宇,等. 实验性牙髓炎疼痛动物模型的建立. *广东牙病防治杂志*, 1999, 7(4): 249 ~ 251
- 4 Marota JJ, Crosby G, Uhl GR. Selective effects of pentobarbital and halothane on c-fos and jun-B gene expression in rat brain. *Anesthesiology*, 1992, 77(2): 365 ~ 371
- 5 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. *Neurosci Lett*, 1994, 173(1-2): 201 ~ 204

- 6 Dong WK, Chudler EH, Kawakami Y. Tooth pulp-evoked potentials in the trigeminal brainstem nuclear complex. *Brain Res*, 1990, 529(1-2): 131 ~ 142
- 7 Fu W, Shah SR, Jiang H, et al. Transcription of proenkephalin gene by htv-1 TAXE protein in glial cells: involvement of fos/jun complex at anape element in the proenkephalin gene promoter. *J Neurovirel*, 1997, 3(1): 16 ~ 27
- 8 Won JS, Kim YH, Song DK, et al. The effect of cycloheximide on the regulation of proenkephalin and prodynorphin gene expressions induced by kainic acid in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 47(1-2): 303 ~ 310
- 9 Wu SX, Li YQ, Shi JW. Temporal changes of preproenkephalin mRNA and leu-enkephalin-like immunoreactivity in the neurons of the caudal spinal trigeminal nucleus and upper cervical cord after noxious stimuli. *J Hirnforsch*, 1998, 39(2): 217-222
- 10 Shibutani T. Mechanism of the modulation of pain transmission at the subnucleus caudalis of the trigeminal sensory nuclear complex in rabbits. *Osaka Daigaku Shigaku Zasshi*, 1990, 35(2): 594 ~ 608
- 11 Ma W, Ribeiro-da-Silva A, De koninck Y, et al. Substance P and enkephalin immunoreactivities in axonal presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons: An ultrastructural multiple-labelling study in the cat. *Neuroscience*, 1997, 77(2): 792 ~ 811

(2000-08-28 收稿, 2001-06-15 修回)

(本文编辑 刘 怡)