

脑啡肽神经纤维在猫颞下颌关节内的分布 ——免疫组织化学 PAP 法

刘 静 徐樱华 李云庆 邢飞跃 范学斌

摘要 应用免疫组织化学 PAP 法对亮氨酸-脑啡肽(L-ENK)神经纤维在猫颞下颌关节(TMJ)内的分布作了研究。结果表明:TMJ 囊及关节盘前后附着内均见 L-ENK 阳性纤维分布,并以细枝丛状分布多见;关节囊滑膜下层的阳性纤维分布密度最高,并可见丛状结构突向滑膜层;关节囊外侧壁及关节盘前后附着内的阳性纤维分布密度相似,关节盘中部未见阳性纤维分布。结果提示:TMJ 内存在内源性镇痛机制的物质基础。

关键词 亮氨酸脑啡肽(L-ENK) 神经纤维 颞下颌关节 PAP 法 猫

脑啡肽(enkephalin, ENK)为内源性阿片样多肽家族的成员之一,最先被 Hughes¹ 从猪、牛、大鼠及兔等动物的脑组织以及豚鼠回肠中发现并分离提纯的具有阿片样活性的神经肽类物质。脑啡肽从化学结构上又分为甲硫氨酸脑啡肽(methionine-enkephalin, M-ENK)和亮氨酸脑啡肽(leucine-enkephalin, L-ENK)两种类型,它们在脑内有相似分布。继 ENK 发现之后,又有一些阿片样多肽被发现,如 β 内啡肽、 α 内啡肽、 γ 内啡肽及强啡肽等,它们与 ENK 共同组成内源性阿片样物质,在痛觉感受和镇痛中起着重要作用。长期以来,对 ENK 的研究大都是从中枢分布及其中枢效应方面进行的,而对它在外周组织器官的分布及其局部生理作用方面的研究尚少。目前,随着研究的深入,已有资料证明,ENK 及其它阿片肽类物质的镇痛作用除为中枢过程外,还具有外周镇痛作用^{2,3},在局部炎症状态下,该作用更为显著^{4,5}。另有研究表明,阿片肽类物质还与局部炎症和免疫调节有关^{6,7}。当今,对阿片肽类物质外周效应的研究已越来越得到学者们的重视,其外周效应的发挥与它在组织器官内的分布有密切关系,因此,对阿片肽类物质在外周组织器官内分布的研究,将对进一步阐明其局部生理作用及机制,提供必要的形态学资料。

目前,对口腔颌面部组织器官内 ENK 神经纤维的分布研究尚少,国内外均未见有关颞下颌关节(TMJ)内 ENK 神经纤维分布的报道,为此,本实验对猫的 TMJ 囊及关节盘附着内 ENK 神经纤维

的分布情况作了研究,为探索其生理意义奠定神经解剖学基础,从神经生物学角度拓展 TMJ 疼痛及镇痛研究的新课题,为临床寻找有效的镇痛方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年健康猫 6 只,雌雄不限,体重 2~3 kg。

1.2 实验试剂

兔抗 L-ENK 血清、羊抗兔 IgG 血清和 PAP 复合物(免过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物)均为美国 NC 产品, DAB (四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺)为日本和光纯药株式会社产品。

1.3 实验过程

1.3.1 动物的灌注和固定 2.5% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)经腹腔注射,动物在深麻醉下开胸,经升主动脉插管,生理盐水快速输入,继之用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB, pH 7.4)配制的 4% 多聚甲醛和 0.05% 戊二醛混合固定液 1500 ml 灌注。

1.3.2 关节囊和关节盘标本制备 动物固定完毕后,在颞弓根部纵行切开皮肤,剔除表层组织,显露关节囊外侧壁,仔细分离四周肌肉组织,充分暴露关节囊及其附着,松解关节囊附着并将其连同关节盘一起取下,将关节囊、关节盘中部及关节盘前后附着 4 部分分装在上述新鲜固定液中 24 h

作者单位:563003 遵义医学院口腔解剖生理教研室(刘静),华西医科大学口腔医学院(徐樱华),第四军医大学人体解剖学教研室(李云庆),遵义医学院病理生理教研室(邢飞跃),遵义医学院人体解剖学教研室(范学斌)

(4), 再将其分别移入含 30% 蔗糖的 0.1 mol/L PB 中, 4 过夜, 直至沉底。用恒冷机作连续切片, 片厚 30 μm, 4 部分标本切片分别收集于 0.01 mol/L 磷酸盐溶液 (PBS, pH 7.4) 的容器中。

1.3.3 免疫组织化学反应 采用 Sternberger 的 PAP 法, 操作步骤按实验常规进行。显微镜观察并摄片。

1.4 对照实验

空白对照: 用 0.01 mol/L PBS 置换兔抗 L-ENK 血清。
血清代替对照: 用正常兔血清代替兔抗 L-ENK 血清。

2 结 果

在光镜下着重观察了 L-ENK 免疫阳性神经纤维分布的位置、范围、密度和 阳性纤维的形态、粗细等。

2.1 L-ENK 免疫阳性纤维的形态及在关节囊、关节盘附着分布的情况

高倍镜视野下, L-ENK 纤维呈棕褐色, 其形态大多为细纤维 (直径小于 0.5 μm), 可构成丛状分布。也有中等粗细 (直径 0.5~0.9 μm) 的纤维, 可见少许膨体 (图 1~4)。在关节囊、关节盘附着内均有上述 L-ENK 免疫阳性纤维分布, 其在关节囊外侧及关节盘前后附着内的分布密度基本相似, 滑膜下层内富含 L-ENK 阳性细纤维, 并可成丛状突向滑膜层, 在丛状结构的基部可见中等粗细的纤维, 行径较直, 有少许膨体 (图 1~3), 关节盘中部未见 L-ENK 免疫阳性纤维。

2.2 L-ENK 免疫阳性纤维在关节囊及关节盘附着内分布密度的比较

对 12 例关节囊及关节盘前后附着标本的组织切片, 按各部位分别随机选择 3 张切片, 每个部位共观察 36 张切片, 360 个视野 (因对所有关节盘中部切片的观察均未见 L-ENK 阳性纤维分布, 故未将其归入密度比较表中)。将 L-ENK 阳性纤维分布密度定为如下 3 个等级:

- I 级: 0~5 根阳性纤维/每一高倍镜视野;
- II 级: 6~10 根阳性纤维/每一高倍镜视野;
- III 级: 10 根以上或呈网状/每一高倍镜视野。

以高倍镜视野数为单位, 对随机选出的各部位切片进行观察, 结果见附表。

经统计学检验表明: 滑膜下层与关节囊外侧壁、关节盘前后附着的 L-ENK 阳性纤维分布密度构成比有显著性差异 ($P < 0.01$), 前者高于后者, 关节囊外侧壁及关节盘前后附着三者间 L-

ENK 阳性纤维分布密度构成比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

附表 L-ENK 阳性纤维在关节囊及关节盘前后附着分布密度比较

密度等级	关节囊外层	滑膜下层	关节盘前附着	关节盘后附着	合计
I	183	98	188	185	654
II	165	132	162	164	623
III	12	130	10	11	163
合计	360	360	360	360	1440

2.3 对照实验: 空白对照、血清代替对照均未显示特异性免疫反应。

3 讨 论

关于 ENK 神经纤维在 TMJ 的分布情况, 目前国内尚未见报道, 对身体其它部位关节内 ENK 神经纤维分布的研究也较少。Gronblad 等⁸ 应用免疫荧光组织化学的方法对患膝关节、腕关节及髋关节炎的患者摘除的关节盘、关节滑膜的研究, 观察到 P 物质及 ENK 阳性纤维均分布于滑膜内, 关节半月板内无阳性 ENK 纤维分布。Abramovici 等⁹ 报道, 在猫的膝关节滑膜囊内含有 ENK 阳性细纤维分布, 且还有其它一些肽类神经纤维分布, 如 P 物质, 5-羟色胺, 血管活性肠肽。本文应用较灵敏的免疫组织化学 PAP 法对猫 TMJ 囊及关节盘附着内 L-ENK 神经纤维的分布情况进行了研究, 发现在 TMJ 囊及关节盘前后附着内均有 L-ENK 阳性纤维分布, 以细纤维多见。与全身其它关节内 ENK 神经纤维分布的研究所获阳性结果相似。同时, 作者还对 L-ENK 阳性纤维在 TMJ 内的分布范围及分布密度进行了分级比较, 得出: 滑膜下层含有较丰富的 L-ENK 阳性纤维, 其分布密度高于关节囊外层及关节盘前后附着, 而关节囊外层及关节盘前后附着间无显著性差异, 关节盘中部未见阳性 L-ENK 纤维分布。

ENK 作为组成机体内源性阿片类物质的成员之一在中枢内与其特定的阿片受体相结合发挥镇痛效应已被大量研究所证实。随着研究的深入和有关资料的积累, ENK 和其它肽类物质的外周镇痛作用目前已得到确定, 且还参与炎症和免疫调节作用。Smith 等² 报道, 在醋酸引起的小鼠扭体实验

中,使用不能透过血脑屏障的N-甲基吗啡,也能产生和使用吗啡一样的镇痛效果,且镇痛作用可被不透过血脑屏障的N-甲基纳洛酮所阻断,因而确证了内脏痛反应中吗啡样外周镇痛作用的存在。Stein等³将22例做膝外科手术的患者,随机分为关节内注射纳洛酮和静脉内注射纳洛酮两组,其结果表明,所有疼痛记分以关节内注射纳洛酮组高于静脉内注射组。因此,可以认为存在于关节滑膜内的阿片肽可与其阿片受体相结合发挥镇痛效应。Stein等⁴报道,冷水游泳对单侧佐剂性关节炎大鼠的患侧具有明显的镇痛作用,而对健侧痛阈影响不大,该作用可被大鼠足底注射纳洛酮所阻断,该结果进一步表明阿片肽类物质所具有的外周镇痛作用,且这种镇痛作用在炎症状态下尤为明显。Stein等⁵发现在局部炎症组织内浸润的免疫细胞中含有ENK、 β 内啡肽强免疫成分,并认为这些阿片肽类物质可在某些特殊的刺激(如冷水、针刺等)下增加释放,与神经末梢上的阿片受体相结合产生镇痛效应。作者对猫TMJ及Abramovici等⁹的研究均为ENK的外周镇痛作用提供了形态学依据。结合上述研究结果,可推测存在于TMJ内的ENK神经纤维在受到特定的局部刺激(如应激、针刺等)时,可从神经末梢释放ENK,并作用于阿片受体发挥局部镇痛效应,从而阻止疼痛信息向中枢传递。在颞下颌关节炎时,关节内的ENK含量将有所增加,以增强镇痛作用。要确定该推断,尚需作进一步研究。

近来,已有资料表明,阿片肽类物质除具外周镇痛作用外,还参与局部炎症和免疫调节作用。Green等⁶报道, δ 、 κ 阿片受体激动剂可抑制由缓激肽所致的大鼠膝关节神经源性血浆渗出,发挥抗炎作用。Persson等¹⁰用福氏佐剂造成大鼠单侧性关节炎15d后,脑脊液中强啡肽转化酶活性明显下降,提示对强啡肽的降解作用减缓,脑脊液中强啡肽浓度将升高。Shiga等⁷报道,在类风湿关节炎的滑液中ENK的含量高于血浆中的含量,并与 β 白细胞介素1的浓度呈正相关,故而提示ENK可由滑膜组织局部产生,并可能在类风湿关节炎中发挥免疫调节和抗炎作用。本结果表明,在TMJ内富含ENK阳性纤维,在颞下颌关节炎过程中,ENK可能参与炎症和免疫调节作用,笔者认为在

临床治疗颞下颌关节炎及疼痛时,是否可考虑使用阿片肽受体激动剂和ENK酶抑制剂,以增加TMJ内的ENK含量,从而达到有效的镇痛目的。

本文对TMJ内ENK神经纤维分布的研究,从神经生物学角度揭示了TMJ内存在有内源性镇痛机制的物质基础,为进一步研究其生理意义提供了形态学资料。作者期待该研究的深入将会寻求到治疗TMJ疼痛及炎症的理想途径和方法。

(本文图见中心插页14)

4 参考文献

- 1 Hughes J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res*, 1975, 88: 295
- 2 Smith TW, Buchan P, Parsons DN, et al. Peripheral antinociceptive effects of N-methylmorphine. *Life Sci*, 1983, 31: 1205
- 3 Stein C, Hassan AH, Lehrberger K, et al. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet*, 1993, 342: 321
- 4 Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and β -endorphin. *J Neurosci*, 1990, 10: 1292
- 5 Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5935
- 6 Green PG, Levine JD. Delta and Kappa-opioid agonists inhibit plasma extravasation induced by bradykinin in the knee joint of the rat. *Neuroscience*, 1992, 49: 129
- 7 Shiga H, Yoshino S, Nakamura H, et al. Role of opioid peptide in rheumatoid arthritis: detection of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in synovial tissue. *Arterio*, 1993, 42: 243
- 8 Grönblad M, Korkkala O, Liesil P, et al. Innervation of synovial membrane and meniscus. *Acta Orthop Scand*, 1985, 56: 484
- 9 Abramovici A, Daizade I, Yosiopovitch Z, et al. The distribution of peptide-containing nerves in the synovia of the cat knee joint. *Histo-Histopathol*, 1991, 6: 469
- 10 Persson S, Post C, Weil-Fugazza J, et al. Decreased cerebrospinal fluid neuropeptide-converting enzyme activity in monoarthritic rats. *Neurosci Lett*, 1992, 143: 247

(1997-01-13 收稿)

Distribution of Leucine-enkephalin Like Immunoreactive Nerve Fibers in Feline Temporomandibular Joint: An Immunohistochemical PAP Method

Liu Jing, Xing Feiyue, Fan Xuebin

Zunyi Medical College

Xu Yinghua

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Li Yunqing

Department of Anatomy, the Fourth Military Medical University

Abstract

In this paper, the immunohistochemical PAP method has been used for the investigation of the distribution of leucine-enkephalin (L-ENK) like immunoreactive fibers in feline temporomandibular joint (TMJ). The results demonstrated as follows: the TMJ capsule, anterior and posterior disc attachments all contained L-ENK immunoreactive nerve fibers which appeared largely as the fine plexi fibers. The density of the distribution of L-ENK positive nerve fibers was the highest in the subsynovium of TMJ capsule, and the plexi structures proceeding to the synovial membrane were observed. The density of the distribution in the lateral joint capsule was the same as the density of distribution in the anterior and posterior discs attachments. No L-ENK positive fibers were detected in the central portion of joint disc. These results indicate that there is the material basis of endogenous analgesic mechanism in TMJ and provide the neuroanatomical basis for exploring physiological functions such as analgesic, immunological and anti-inflammatory effects of ENK nerve fibers in TMJ.

Key words: leucine-enkephalin nerve fiber temporomandibular joint immunohistochemical PAP method

中华口腔医学会修复学科专业委员会成立大会暨 第三届全国口腔修复学学术会议在沪举行

中华口腔医学会口腔修复学科专业委员会成立大会暨第三届全国口腔修复学学术会议,于1997年9月10~14日在上海教育国际交流中心隆重举行,来自全国31个省、市、自治区的320名代表参加了这次会议,徐君伍教授任会议主席,杨宠莹教授任执行主席。中华口腔医学会会长张震康教授、副会长邱蔚六教授、樊明文教授、颜声芳教授参加了大会,并在会上作了重要讲话。香港特别行政区牙医协会会长黄永标先生率香港代表团,日本国齿科修复学会副会长川添尧彬教授及著名口腔修复学者堤定美、权田悦郎、井上昌幸、片山伊九右卫门教授等率日本朋友16人到会祝贺并参加了大会。

会议正式宣布了中华口腔医学会修复学科专业委员会的成立及专业委员会名单。这是中华口腔医学会正式成立以来,所建立的第一个专业委员会,它的成立标志着中国口腔修复学的发展进入了一个新的阶段。中华口腔医学会主任委员张震康教授代表大会对专业委员会的成立表示热烈祝贺,也对学会的成立和发展提出了具体的要求。修复学专业委员会主任委员马轩祥教授向大会作了关于学会今后建设和工作计划的讲话。

会议向近年间故世的老一辈口腔修复学专家陈安玉、欧阳官、魏治统、廖蕴玉教授表达了沉痛悼念和深切缅怀。

学术会议收到了来自全国各地的论文540余篇,论文覆盖了全口义齿、固定义齿、可摘部分义齿、种植义齿、颌面赈复体、美容牙科、修复新材料、新技术等各个领域,充分展示了4年来我国口腔修复学中所取得的成果,论文的总体水平较上届大会有了显著的提高。国际口腔修复的各前沿课题中,我国学者都已有相应的研究,其中一些课题已达到了国际先进水平,如对种植义齿的临床技术、设计形式及其应力分布形式,以及对种植义齿结构的研究;应用相移法、随机数字散斑法和投影光栅变形条纹直接分析法进行的牙冠外形测量和重建;对钛合金在口腔修复中的应用技术和相应基础研究,以及新型齿科钛合金的研究;三维有限元动态分析方法及电子散斑、干涉等技术的应用;对颞下颌关节紊乱症超微结构、生物化学改变的研究;上下颌骨缺损后的功能重建,种植式仿真义耳、仿真义眼的实现等等。此外,在附着体技术,牙齿的色彩学研究,新型齿科陶瓷的研究,粘接材料及技术的研究,计算机模拟技术在口腔修复中的应用等多个方面也都取得了可喜的进展。本届大会交流的论文将研究与临床工作紧密结合,显示我国口腔修复工作者总体水平的提高。

这次大会是本世纪我国口腔修复学界举行的最后一次全国性会议,是一次承先启后成功的大会,会议决定:2001年将在成都,由华西医科大学口腔医学院承办第四届全国口腔修复学学术会议。
(赵钦民 张富强)