

· 基础研究 ·

低频脉冲磁刺激对大鼠牙髓组织内降钙素基因相关肽免疫阳性神经纤维的影响

马净植 徐钰 曹颖光

【摘要】目的 探讨低频脉冲磁刺激对大鼠牙髓组织内降钙素基因相关肽(CGRP)免疫阳性的神经纤维的影响。**方法** 选择健康 Sprague-Dawley 大鼠 15 只,随机分为对照组、多次磁刺激组和单次磁刺激组,每组 5 只。后两组采用低频脉冲磁刺激大鼠颌面部,频率为 2 Hz,强度峰值为 2 T。多次磁刺激组每日给予 1 次连续 30 个脉冲的磁刺激,连续刺激 6 d;单次磁刺激组仅给予 1 次 30 个脉冲的磁刺激。取上颌磨牙制备标本,CGRP 免疫组织化学染色,显微镜观察阳性神经纤维密度并进行统计学分析。**结果** 多次磁刺激组大鼠牙髓上段和髓角处 CGRP 阳性神经纤维明显增多,染色增强,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而单次磁刺激组大鼠牙髓上段和髓角处 CGRP 阳性神经纤维明显减少,染色变淡,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 多次连续低频脉冲磁刺激可促进牙髓组织内 CGRP 的表达,单次低频脉冲磁刺激可促进组织中部分 CGRP 释放,使其在组织中表达减少,其机制及生物学意义尚需深入探讨。

【关键词】 脉冲磁刺激; 降钙素基因相关肽; 牙髓

The effects of impulse magnetic stimulation on calcitonin gene-related peptide in rat dental pulp MA Jing-zhi*, XU Yu, CAO Ying-guang. * Department of Stomatology, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: MA Jing-zhi, Email: songke_coco@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of impulse magnetic stimulation (IMS) on calcitonin gene-related peptide(CGRP) in rat dental pulp. **Methods** Fifteen Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and two experimental groups A and B. The maxillofacial regions of the rats were exposed to IMS at 2.0 Hz and 2 T. The rats in group A were exposed to IMS once a day for 6 d, while the rats in the group B were exposed once to IMS. The expression of CGRP in maxillary molars was measured by using immunohistochemical staining. **Results** Compared with that in the control group, the expression of CGRP positive nervous fibers in the superior segment dental pulp and pulp horn were increased significantly in group A ($P < 0.05$), but significantly decreased in group B ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of CGRP in rat dental pulp could be improved by the continuous low frequency IMS, but decreased by the single IMS.

【Key words】 Impulse magnetic stimulation; Calcitonin gene-related peptide; Dental pulp

磁场是对人体安全、简便、有效的治疗手段,已广泛应用于临床实践中^[1]。低频脉冲磁刺激可以促进细胞增殖与分化,增强生长因子和细胞外基质的合成与分泌,已证实其在骨和神经等组织疾病的治疗中具有生物学效应^[2,3]。但低频脉冲磁刺激对牙髓组织的影响鲜见报道。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)作为多功能调节肽,在机体的痛觉传递过程中起着重要作用,牙髓组织中的 CGRP 神经可传递痛觉,影响血流的调节,直接或间接地参与牙髓损伤的修复与炎症反应^[4]。本研究拟采用低频脉冲磁场刺激牙髓,通过观察牙髓组织内 CGRP 免疫阳性神经纤维的变化,探讨其对牙

髓组织的影响。

材料与方法

一、试剂与仪器

试剂包括:美国 Sigma 公司提供的 1:6000 兔抗 CGRP,1:30 的羊抗兔 IgG,武汉博士德公司提供的二氨基联苯胺(diamionben zidene, DAB)。仪器包括:英国产 Magstim200 型经颅磁刺激仪;HPIAS-1000 型彩色病理图文报告分析系统。

二、实验动物分组

选择健康 Sprague-Dawley 大鼠 15 只,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,雌雄不拘,体重 200 ~ 250 g,随机分为对照组、多次磁刺激组和单次磁刺激组,每组 5 只。

三、磁刺激方法

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院口腔医学中心(马净植、曹颖光);应城市人民医院口腔科(徐钰)

通讯作者:马净植,Email:songke_coco@163.com

脉冲磁刺激强度峰值为 2 T,取最大输出强度的 70%,刺激频率为 2 Hz。将清醒的大鼠置于长方形器具中,固定头部,采用直径为 4 cm 的圆形线圈,水平置于大鼠颌面部上方,中心对准两侧上颌第 1 磨牙连线的中点。多次磁刺激组每次连续给予 30 个脉冲的磁刺激,每日 1 次,连续 6 d,隔日制备标本;单次磁刺激组连续给予 30 个脉冲的磁刺激后即刻制备标本。

四、标本制备

3%戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠(0.5 ml/只),打开胸腔暴露心脏,用输液管从左心室插入主动脉,以 37℃的生理盐水冲洗后用 4%的冷多聚甲醛液灌注固定。取大鼠上颌骨,去除骨表面软组织,置乙二醇四乙酸二钠中脱钙 20 d;将脱钙的上颌骨置于 20%的蔗糖中 4℃下过夜;沿近远中方向于恒冷箱中纵行切片,片厚约 30 μm。

五、免疫组织化学染色

室温下用 3% H₂O₂ + 甲醇(1:4)孵育 1 h,用 0.02 mol/L 的 PBS (pH 值 7.4)漂洗;用 0.25% 的 Triton X-100 于 37℃下作用 30 min;用 3% 牛血清白蛋白于 37℃下作用 30 min;用 1:6000 的兔抗 CGRP 血清于 37℃下作用 2 h,4℃下作用 96 h,用 PBS 漂洗;用 1:30 的羊抗兔 IgG 于 37℃下作用 1 h 后 PBS 漂洗;用 1:30 的氧化物酶-抗过氧化物酶于 37℃下作用 1 h;用 0.05% 的 DAB、0.01% 的 H₂O₂ Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 7.6)于室温下显色 10 min;酒精梯度脱水,二甲苯透明,树胶封片,显微镜观察。以每 50 μm² 面积的纤维交叉点数来表示 CGRP 免疫阳性神经纤维的密度。

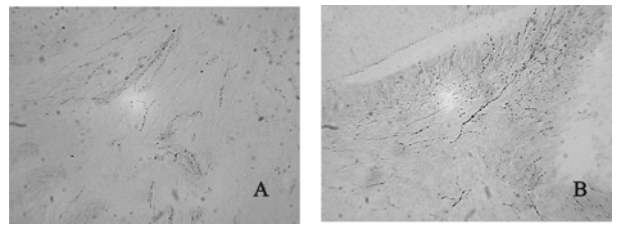
六、统计学分析

各组标本取相同数量的牙切片(5 张/标本),采用图像分析仪分析单位面积内 CGRP 免疫阳性纤维密度,全部数据录入计算机。采用 SPSS 12.0 版统计分析软件,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验组和对照组之间比较采用 *t* 检验。

结 果

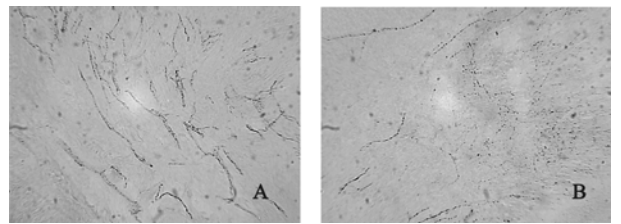
免疫组织化学染色结果显示,对照组 CGRP 免疫阳性神经纤维大鼠第 1 磨牙根髓上段多呈束状,念珠样分布(图 1A);进入冠髓后逐渐分散,在髓角处纤维呈网状结构,并分支进入成牙本质细胞层及牙本质层内(图 1B)。多次磁刺激组牙髓组织中根髓上段和髓角处 CGRP 阳性神经纤维数增多(图 2),阳性神经纤维密度与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。单次磁刺激组大鼠牙髓组织中根髓上段和髓角处 CGRP 阳性神经纤维则明显减少,染色变淡(图 3),阳性神经纤维密度与对照组比较,差异有统计学

意义($P < 0.01$),见表 1。



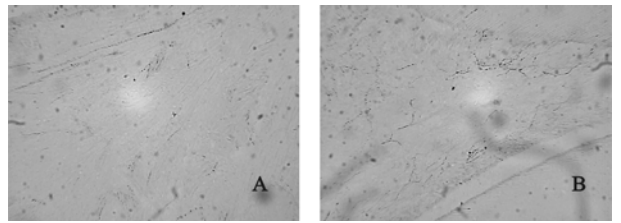
A 上颌第 1 磨牙根髓上段多呈束状,念珠样分布; B 上颌第 1 磨牙在髓角处纤维呈网状结构,并分支进入成牙本质细胞层及牙本质层内

图 1 对照组(免疫组织化学染色,×100)



A 大鼠上颌第 1 磨牙根髓上段 CGRP 阳性神经纤维数增多; B 大鼠上颌第 1 磨牙髓角处 CGRP 阳性神经纤维数增多

图 2 多次磁刺激组(免疫组织化学染色,×100)



A 大鼠上颌第 1 磨牙根髓上段阳性神经纤维数量减少,染色变淡; B 大鼠上颌第 1 磨牙髓角处阳性神经纤维数量减少,染色变淡

图 3 单次磁刺激组(免疫组织化学染色,×100)

表 1 各组牙髓组织 CGRP 免疫阳性神经纤维密度的比较(交叉点数/50 μm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	CGRP 免疫阳性纤维密度
对照组	5	0.152 ± 0.005
多次磁刺激组	5	0.189 ± 0.024 ^a
单次磁刺激组	5	0.098 ± 0.013 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

讨 论

近年对磁场的研究显示,脉冲磁刺激对骨组织、神经肌肉组织以及中枢神经均可产生生物学效应,包括对细胞增殖、分化,细胞膜离子流变化、膜电位及其分布,信号传导通路以及 DNA 的合成、表达和修复等均有影响^[1-3,5]。已有研究证实,恒磁场对牙髓组织没有影响^[6],但对牙髓组织内的 CGRP 有影响^[7]。为了深入探讨脉冲磁刺激对牙髓组织的影响,本研究采用经颅磁刺激仪产生的低频脉冲磁场

(频率为 2 Hz)刺激牙髓。经颅磁刺激是根据法拉第定律,当磁刺激仪通过电容器快速放电到线圈时,可产生一个时程极短的强大脉冲磁场,磁场可以无衰减地通过皮肤和骨骼在生物体内诱发感应电流,并以此刺激兴奋组织的技术,该技术被广泛用于研究大脑皮质兴奋、抑制功能^[2]。我们考虑到牙髓周围硬组织的影响,选用了强度较大的低频磁场(强度峰值为 2 T)。结果发现磁刺激大鼠颌面部后,大鼠牙髓组织内 CGRP 阳性神经纤维数量有变化,我们推测脉冲磁场可能通过颌骨和牙体硬组织在牙髓组织内诱发感应电流,进而对牙髓神经产生影响。

CGRP 属于神经肽,存在于神经元中,对中枢神经系统和外周靶组织具有广泛的调节作用。在牙齿及牙周组织,CGRP 免疫阳性神经起自于三叉神经脊束核,主要来源于三叉神经初级感觉神经元,储存于脊束核区域的初级传入末梢中,外周神经受刺激后兴奋,引起中枢末梢大量释放 CGRP,CGRP 可促进 P 物质的释放,完成痛觉向中枢的传递过程^[8]。当牙髓发生炎症或受到刺激时,牙髓神经可能释放 CGRP 等神经肽^[9]。本研究结果显示,在单次连续刺激 30 个脉冲后即刻制备的标本中,CGRP 免疫阳性神经纤维减少,染色变淡,说明受到脉冲磁刺激后牙髓神经末梢释放了部分 CGRP 到组织内,但可能这部分 CGRP 尚不足以诱导产生与痛觉有关的反应。相反,在给予多次连续脉冲磁刺激牙髓后,CGRP 阳性神经纤维增多,这说明多次反复磁刺激影响了牙髓中 CGRP 的释放,增加了其自身的表达,我们推测该组牙髓神经的痛阈可能升高、疼痛敏感性可能降低。Ghione 等^[10]的研究中观察到,40 μ T 的磁刺激可以降低人牙髓的痛阈;也有报道低频磁刺激能导致动物的痛觉减退^[11,12],他们推测这可能是因为连续低频脉冲磁刺激的间歇期延迟了体内内源性化学物质的释放,但还有待进一步研究证实。

CGRP 免疫阳性神经纤维在牙髓组织中的分布十分广泛,除与痛觉传递有关外,还由于其沿血管分布的特点,具有调节牙髓组织血管数量和血流的作用,是目前已知的最强的扩血管物质^[4]。有研究表明,磁刺激可改变血液流变学特性,降低血液黏度,促进血液循环^[13]。本实验结果也发现,多次磁刺激后,牙髓组织中 CGRP 免疫阳性神经纤维数增加,说明磁刺激还可通过影响神经肽间接地调节牙髓组织的血管数量和血流特性。体外细胞实验还观察到,CGRP 能直接作用于牙髓靶细胞,促进牙髓细胞中 I 型胶原 mRNA 表达,显著增强细胞的碱性磷酸酶活性,使骨钙素含量提高,从而调节牙髓细胞的矿化功

能,促进细胞分化,所以 CGRP 增多也可能与修复性牙本质形成有关^[14]。

综上所述,低频脉冲磁刺激可对大鼠牙髓组织内 CGRP 免疫阳性纤维的数量产生影响,但其作用机制是通过磁场直接刺激牙髓神经产生生物学效应,还是通过弥散的磁场经颅作用于中枢神经再间接地影响牙髓等,尚需进一步研究。我们认为,采用多次低频脉冲磁刺激治疗可能降低牙髓的疼痛敏感性,促进修复性牙本质形成,可望成为临床治疗牙髓疾病的一种方法。

参 考 文 献

- [1] 吴慧敏. 物理疗法//周士枋,范振华. 实用康复医学. 南京:东南大学出版社,1998:285-304.
- [2] 吴宗耀. 从经颅磁刺激谈起. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:705-706.
- [3] 张长杰. 电磁场及其生物学效应. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:73-75.
- [4] Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. J Anat, 2003, 202:195-203.
- [5] De Pedro JA, Perez-Caballer AJ, Dominguez J, et al. Pulsed electromagnetic fields induce peripheral nerve regeneration and endplate enzymatic changes. Bioelectromagnetics, 2005, 26:20-27.
- [6] 马育霞,林久祥,谢以岳. 磁场及磁场力对人牙髓影响的组织学观察. 口腔正畸学杂志,1994,1:172-173.
- [7] 赵永康,常新. 磁场对大鼠牙髓中降钙素基因相关肽的作用. 中国医科大学学报,2000,29:31-32.
- [8] Ma W, Chabot JG, Powell KJ, et al. Localization and modulation of calcitonin gene-related peptide-receptor component protein-immunoreactive cells in the rat central and peripheral nervous systems. Neuroscience, 2003, 120:677-694.
- [9] 曹志中,赵皿,胡三觉. 牙髓炎症中降钙素基因相关肽免疫反应性神经纤维的变化. 中华口腔医学杂志,1997,32:164-166.
- [10] Ghione S, Seppia CD, Mezzasalma L, et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on electroencephalographic alpha activity, dental pain threshold and cardiovascular parameters in humans. Neurosci Lett, 2005, 382:112-117.
- [11] Martin LJ, Koren SA, Persinger MA. Thermal analgesic effects from weak, complex magnetic fields and pharmacological interactions. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 78:217-227.
- [12] Martin LJ, Persinger MA. Spatial heterogeneity of the magnetic field during exposures to complex frequency-modulated patterns facilitates analgesia. Percept Mot Skills, 2003, 96:1005-1012.
- [13] 王益民,靳世久,张伯礼,等. 不同强度磁场对人离体血液流变学的影响. 中华理疗杂志,2001,24:29-30.
- [14] 陆群,吴补领,张洪伟,等. 降钙素基因相关肽对人牙髓细胞的矿化影响. 实用口腔医学杂志,2002,18:36-38.

(收稿日期:2006-08-27)

(本文编辑:吴倩)