

牙痛穴贴对急性牙髓炎大鼠 Notch 信号蛋白的影响

董玉杰¹, 李 铁², 孟 晴², 张红石²

摘要 目的 从分子生物学水平揭示穴贴对牙髓的保护作用。方法 选取 60 只 Wistar 大鼠, 所有鼠牙牙体、牙列完整, 无龋病, 咬合关系正常。适应性喂养 1 周后, 随机均分为空白组、模型组、阳溪组、颊车组。空白组: 正常喂养, 不实施任何干预手段; 模型组: 采用开髓封内毒素法(LPS)造急性牙髓炎模型; 阳溪组: 造急性牙髓炎模型, 取远端同侧阳溪穴进行穴位贴敷; 颊车组: 造急性牙髓炎模型, 取近段同侧颊车穴进行穴位贴敷, 牙痛穴贴为自制。采用免疫组化法检测 Notch1、Notch2 蛋白在第 1、3、5 天的表达。结果 Notch1 蛋白: 穴贴治疗第 1 天, 空白组表达量低于模型组、阳溪组、颊车组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 3 天, 模型组蛋白表达量低于阳溪组和颊车组, 但高于空白组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 5 天, 空白组与其它各组比较表达量降低($P < 0.01$)。Notch2 信号蛋白: 穴贴治疗第 1 天, 穴贴各组与模型组和空白组两两比较表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 3 天, 模型组与其它各组比较, 表达高于空白组, 低于穴贴治疗各组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 5 天, 空白组与其它各组比较表达量降低($P < 0.01$)。结论 牙痛穴贴可通过缩短 Notch 信号蛋白表达上调时间, 提高急性牙髓损伤后的自身修复能力, 间接提高牙髓干细胞活性。

关键词 牙穴贴; 急性牙髓炎; Notch 信号蛋白

中图分类号 R 276.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0333-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.006

牙髓炎是临床常见口腔疾病之一。发作时, 患者表现为冷热刺激性疼痛、自发性疼痛和放散性疼痛^[1]。穴贴疗法属于中医常用外治法, 笔者自拟牙痛穴贴治疗急性牙髓炎取得了较好的临床效果。Notch 是一个单次 I 型跨膜蛋白, 最早是由 Dexter 等学者于 1914 年在对果蝇的发育研究中鉴定发现的^[2]。在哺乳动物中, Notch 受体分为 4 个类型(Notch1~4)^[3]。研究^[4]表明, Notch 信号蛋白可以激活牙髓干细胞的特性修复损伤组织的作用。

Notch 受体不在正常牙组织中表达, 而在受伤后表达上调^[5]。该研究^[6]主要是利用了 Notch 这一特性, 从分子生物学水平揭示穴贴对牙髓的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 Wistar 大鼠 60 只, 清洁级, 50~60 d, 体重 190~210 g, 雌雄各半, 长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, 所有鼠牙牙体、牙列完整, 无龋病, 咬合关系正常。适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组、模型组、阳溪组、颊车组, 各 15 只。空白组: 正常喂养, 不实施任何干预手段; 模型组: 造急性牙髓炎模型; 阳溪组: 造急性牙髓炎模型, 取远端同侧阳溪穴进行穴位贴敷; 颊车组: 造急性牙髓炎模型, 取近段同侧颊车穴进行穴位贴敷。

1.2 主要试剂及设备

1.2.1 主要试剂 脂多糖/LPS(生产批号: 20140326-1; 规格: 10 mg; 原始标记: sigma L-2880)、Anti-Notch1 antibody(4i50)(ab64570)、Anti-Notch2 intracellular domain antibody-Cleaved-Asp1733(ab52302)(美国 abcam 公司); UltraSensitive TM SP 试剂盒(批号: 1406269701)、DAB 显色试剂盒(产品序列号: DAB-0031/1031)(福州迈新生物技术开发有限公司); 玻璃离子(上海医疗器械股份有限公司齿科材料厂, 批号: 201401)。

1.2.2 主要设备 真空泵涡轮机(韩国 Strong 公司); Boxun 恒温培养箱(上海实验仪器厂有限公司); RM 2145 半自动切片仪(德国 Leica 公司); 组织脱水机(日本 Sakura Finetek 公司); COIC 显微镜(20030448 号, 日本 Olympus 公司); 彩色摄像机(北京杰伟世视音频设备有限公司); 成都泰盟 BI-2000 医学图像分析系统。

1.3 急性牙髓炎模型的建立 采用开髓封内毒素法(lipopoly saccharides, LPS)建立实验性大鼠磨牙急性牙髓炎模型。0.3% 戊巴比妥钠(13 ml/kg)腹腔注射。大鼠麻醉后取仰卧位, 固定四肢于手术板上, 上下切牙固定, 充分暴露左侧上颌第 1 磨牙, 用特制牙科钻在咬合面开髓, 将浸润 LPS 的棉絮置于窝洞内后用玻璃离子封闭牙洞, 等待大鼠苏醒, 正常进食^[7]。

2016-12-14 接收

基金项目: 吉林省自然科学基金(编号: 201215200)

作者单位: ¹ 吉林省人民医院口腔科, 长春 130021

² 长春中医药大学创新实践中心, 长春 130117

作者简介: 董玉杰, 女, 副主任医师;

张红石, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: aweifrom@163.com

1.4 牙痛穴贴的制备和穴贴治疗 利用王氏穴贴技术^[8],结合以往针刺治疗牙周炎经验^[9],自制牙痛穴贴,裁剪成大小 0.2×0.2 (cm^2)。暴露穴位皮肤,“阳溪穴”“颊车穴”选取参照李忠仁主编《实验针灸学》^[10],并根据大鼠同身寸比例取穴。阳溪(前肢第1掌骨和第2掌骨之间上1寸);颊车(面部咬肌隆起处)。于敷贴后1、3、5 d,每次取5只,用4%多聚甲醛心内灌注处死动物,立即取材分离上颌骨,进行免疫组化观察。同时取空白组、模型组各5只进行对比。

1.5 Notch1、Notch2 蛋白的检测 Notch1、Notch2检测按SP试剂盒步骤完成免疫组化操作。阳性结果:胶原显色棕黄色。封片后利用图像分析系统观察,与阴性片子对照(不加一抗,用PBS代替)随机拍摄5个视野,按阳性面积分析图像得出光密度值(optical density, OD)值。

1.6 统计学处理 实验数据为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 13.0软件进行统计分析,采用 *t* 检验进

行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1 蛋白检测结果与分析 实验结果表明,在正常情况下,Notch1呈低表达或不表达,当牙髓损伤后,其表达开始活跃,这与Notch蛋白对损伤的牙髓组织具有保护作用有关。穴贴治疗第1天,空白组与模型组、阳溪组、颊车组比较出现明显差异($P < 0.05, P < 0.01$),说明此时Notch1已处于活跃状态,但穴贴各组与模型组比较差异不明显,穴贴各组有蛋白增高趋势,但由于标准差较大,所以差异不显著。穴贴治疗第3天,模型组与其他各组比较差异显著($P < 0.05, P < 0.01$),此时穴贴组表达均呈阳性。穴贴治疗第5天,模型组只与空白组比较差异显著($P < 0.01$),而模型与穴贴各组比较差异不明显。穴贴各组与空白组比较差异明显($P < 0.01$)。各组第5天与第3天、第1天比较,Notch1蛋白有活性增高趋势。见图1、表1。

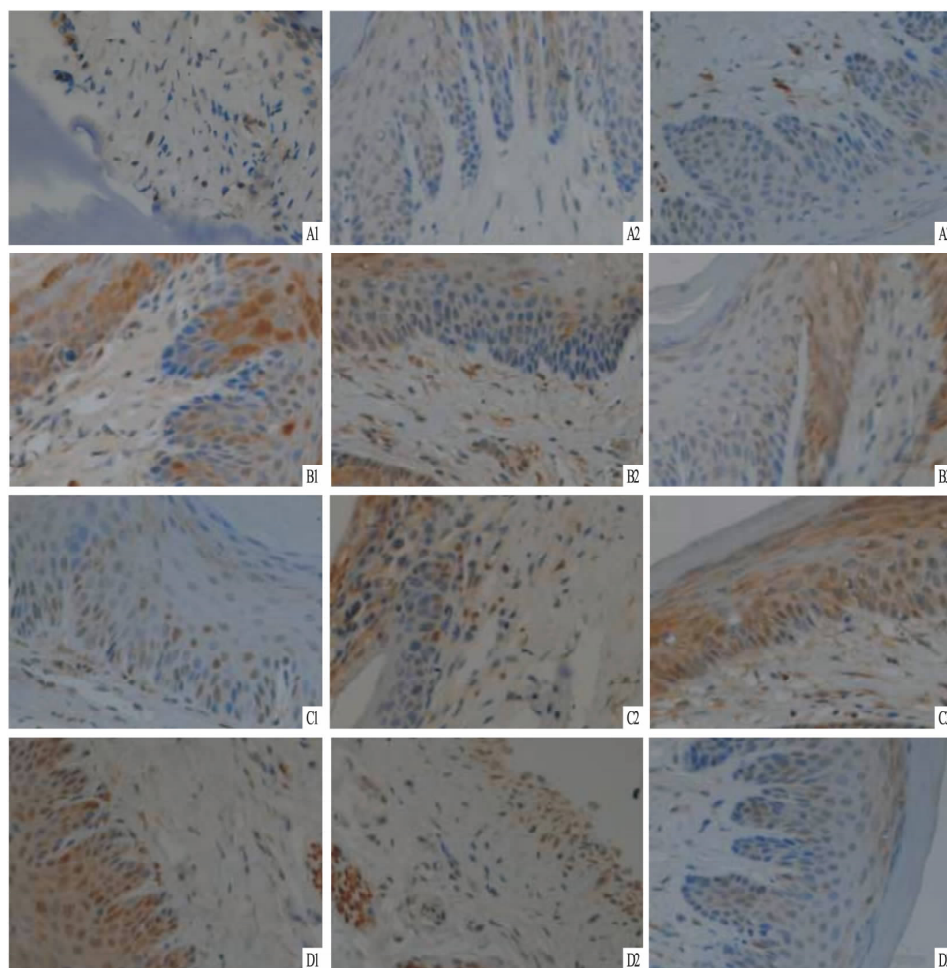


图1 Notch1在牙髓损伤后的表达 SP×400

A: 空白组; B: 模型组; C: 阳溪组; D: 颊车组; 1: 第1天; 2: 第3天; 3: 第5天

表1 Notch1 免疫组化染色 OD 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第5天
空白	10.12 ± 2.10*	11.23 ± 3.10**	10.67 ± 2.70**
模型	28.22 ± 12.10	39.77 ± 10.70	60.12 ± 13.20
阳溪	45.22 ± 19.10 [△]	60.11 ± 10.60** [△]	69.24 ± 9.70 [△]
颊车	42.52 ± 18.40 [△]	58.73 ± 9.70** [△]	68.44 ± 10.20 [△]

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与空白组比较: $\Delta P < 0.01$

2.2 Notch2 蛋白检测结果与分析 实验结果表明, Notch2 蛋白在正常情况下, 呈极低表达或不表达。当牙髓出现损伤时早期增高不明显, 牙髓损伤第1天, 模型组与空白组比较差异无统计学意义, 而穴贴各组与模型组和空白组两两比较差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$), Notch2 蛋白活性增加。在穴贴治疗第3天, 模型组与其它各组比较出现显著性差异, 穴贴各组 Notch2 蛋白活性高于模型组 ($P <$

0.01)。在穴贴治疗第5天, 除空白组外, 其它各组 Notch2 活性继续升高, 但阳溪组与模型组差异无统计学意义。各组第5天与第3天、第1天比较 Notch2 蛋白有活性增高趋势。见表2、图2。

表2 Notch2 免疫组化染色 OD 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第5天
空白	6.20 ± 1.20	7.40 ± 0.70*	7.20 ± 1.20**
模型	10.27 ± 9.10	18.72 ± 10.60	51.72 ± 11.20
阳溪	31.62 ± 12.20** [△]	51.31 ± 10.20** [△]	62.24 ± 10.70 [△]
颊车组	34.52 ± 13.90** [△]	49.63 ± 10.40** [△]	69.14 ± 9.50** [△]

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与空白组比较: $\Delta P < 0.01$

3 讨论

穴贴疗法历史悠久, 笔者所在的科研团队在多年临床经验积累下, 研制牙痛穴贴, 在临床治疗牙髓

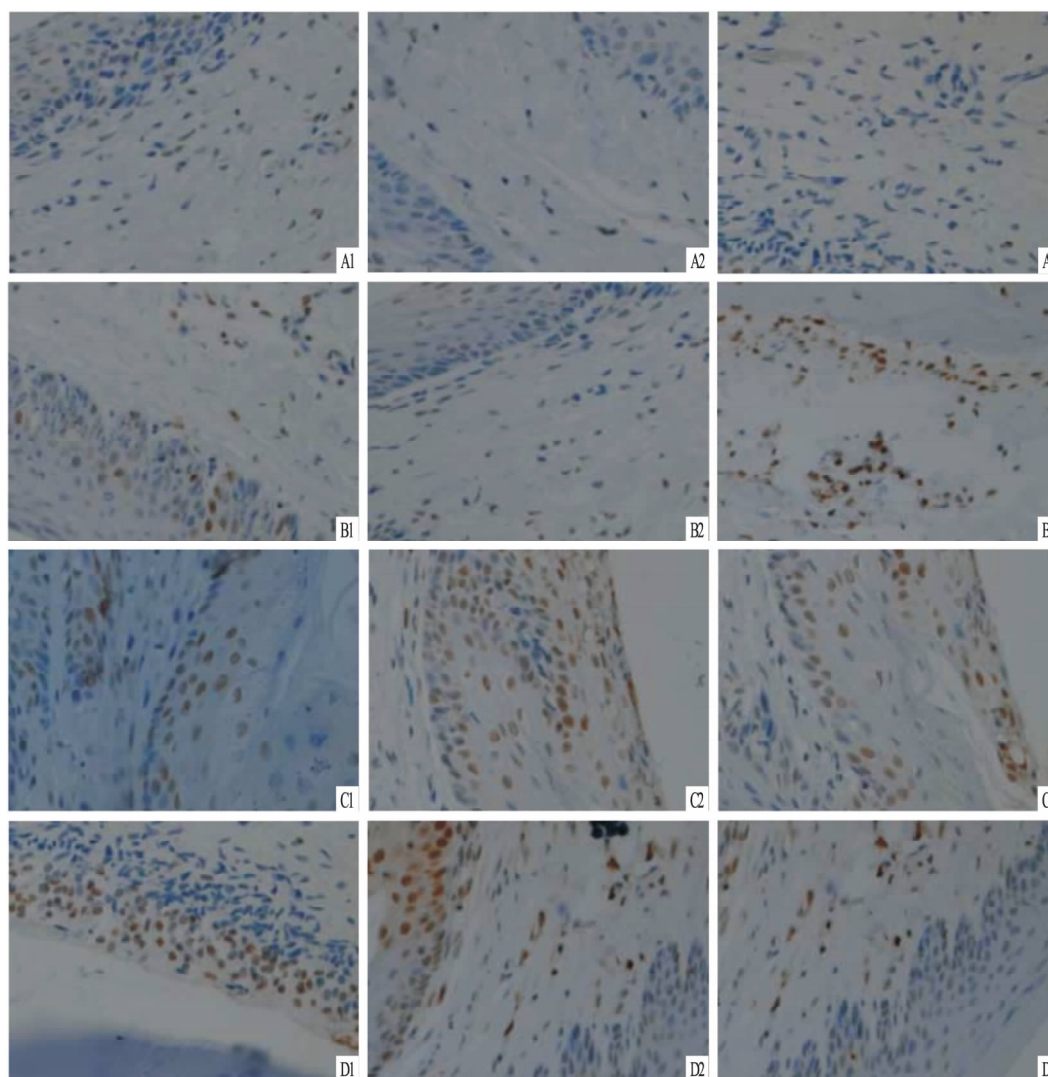


图2 Notch2 在牙髓损伤后的表达 SP × 400

A: 空白组; B: 模型组; C: 阳溪组; D: 颊车组; 1: 第1天; 3: 第3天; 5: 第5天

疾病方面取得较好疗效,但一直缺乏机制研究,同时对穴贴时效性研究也略显不足。因此,本研究着重从两方面入手,一是观察穴贴对牙髓保护作用分子的生物学机制,二是观察治疗时效性。本研究选择的观察指标是 Notch 信号蛋白,因该蛋白的部分功能缺失而造成果蝇翅膀边缘出现缺口,由此将该蛋白命名为 Notch 蛋白^[11]。研究^[12]表明,Notch 参与了成牙本质细胞的损伤修复,Notch1 信号蛋白在大鼠牙髓损伤后早期阶段表达逐渐上调,随后在成牙本质细胞区及富细胞区牙髓细胞中表达增强,并沉积于穿髓点附近的细胞增殖层。Notch2 在牙髓损伤应激情况下在牙髓间充质细胞和成牙本质细胞中上调表达,对于启动牙髓自我修复、诱导牙髓间充质细胞功能性分化以及抑制受损成牙本质细胞凋亡、维系和调动其相对正常的生理功能可能具有重要作用^[13]。Notch2 在牙髓牙本质复合体发育过程中可能发挥重要作用^[14-15]。本研究显示,经过穴贴治疗后,Notch 信号蛋白表达上调时间明显缩短,在第 3 天穴贴组与模型组比较差异显著,证明穴贴干预了早期牙髓损伤后的修复作用,提高了 Notch 信号蛋白表达的活性。但模型组与穴贴组比较,只有颊车组与模型组的 Notch2 比较出现显著差异,其它各组无显著差异,这与 Notch 在第 5 天进入表达增强期关系密切。Notch 蛋白属于自身修复性蛋白,在牙髓损伤后被激活,在第 5 天呈活跃表达。穴贴可有效缩短其表达上调时间,但不能使其过度表达。这表明穴贴干预只是在正常值范围内缩短了起效时间。

综上所述,牙痛穴贴可有效提高急性牙髓损伤后的自身修复能力,通过缩短 Notch 信号蛋白表达上调时间,间接提高了牙髓干细胞活性。这种干预作用在损伤后第 3 天表达明显。提示牙痛穴贴早期治疗是其提高治疗效果的关键。在第 5 天,因牙髓自身修复能力的提升,穴贴的干预作用开始下降。但 Notch 在第 7 天表达恢复正常,此时穴贴能否继续起到干预作用,本研究尚未涉猎^[14]。因此,本研

究还应在现有基础上延长干预时间,才能更全面的描述穴贴干预的时效性。

参考文献

- [1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:185-226.
- [2] 常思佳,邹晓英,庄 娟,等. 激活 Notch 信号通路可延迟人牙髓细胞的老化表现[J]. 北京大学学报(医学版),2014,46(1):5-11.
- [3] 孙丽哲,侯 林. Notch 的结构、功能和相关信号通路[J]. 中国细胞生物学报,2010,32(6):914-21.
- [4] 邹晓英,庄 娟,岳 林,等. DAPT 对人牙髓细胞 Notch 信号通路和细胞增殖的影响[J]. 北京大学学报(医学版),2013,45(2):274-9.
- [5] 武 曦. Notch 信号通路在牙髓干细胞增殖和分化中的调控作用[J]. 牙体牙髓牙周病杂志,2011,21(5):298-302.
- [6] Mitsiadis T A, Fried K, Goridis C. Reactivation of Delta-Notch signaling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(2):312-8.
- [7] 顾 斌,刘洪臣,郭 宏,等. 大鼠急性牙髓炎动物模型的建立[J]. 中华老年口腔医学杂志,2009,7(5):304-7.
- [8] 徐 峰,高 进,鄢丽丽,等. 艾络康罗布麻穴贴治疗原发性高血压的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2014,34(11):5999-6000.
- [9] 董玉杰. 针刺治疗慢性牙周炎胃火上蒸型 53 例[J]. 长春中医药大学学报,2010,26(1):95.
- [10] 李忠仁. 实验针灸学[M]北京:中国中医药出版社,2003:314-330.
- [11] Fiuzza U M, Arias A M. Cell and molecular biology of Notch[J]. *J Endocrinol*,2007,194(3):459-74.
- [12] Kimble J, Simpson P. The LIN-42/Notch signaling pathway and its regulation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*,1997,13:333-61.
- [13] 郭卫拉,赵守亮,周黎安,等. Notch 1 信号蛋白在早期牙髓损伤修复中表达的免疫组化研究[J]. 临床口腔医学杂志,2005,21(3):156-7.
- [14] 马 亮,张亚庆,王胜朝,等. Notch-2 在大鼠牙髓炎中的时空分布及其意义[J]. 实用口腔医学杂志,2009,25(6):789-802.
- [15] 陈 旭,汤玲玲,陈 敏,等 Notch2 在人恒牙牙髓及牙乳头中表达研究[J]. 中国实用口腔科杂志,2012,5(7):417-20.

Effect on acute pulpitis of Notch signaling proteins by toothache point stick

Dong Yujie¹, Li Tie², Meng Qing², et al

(¹Dept of Stomatology, The People's Hospital of Jilin Province, Changchun 130021;

²Innovation Practice Center, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117)

Abstract Objective To explore the protective effect of dental pulp by toothache point stick and its molecular bio-

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.014.html>

双氧化酶 2 在 5-羟色胺加重的小鼠结肠炎模型中的表达及作用

董仕桢^{1,2}, 陈梦露², 戴发亮^{1,3}, 轩青霞¹, 陈攀¹, 冯丹丹¹, 常永超², 高强^{1,4}

摘要 目的 探讨 5-羟色胺(5-HT)对双氧化酶 2(Duox2)在小鼠结肠组织中的表达情况及其在炎症中的意义。方法 选取 6~8 周龄的健康清洁级 C57BL/6J(B6) 雄性小鼠,随机分为 5 组($n=8$): 对照组自由饮用无菌蒸馏水; 葡聚糖硫酸钠(DSS)(1.0%、2.5%) 组自由饮用相应浓度的 DSS 溶液; 5-HT 组采用直肠灌药方式(1.0 mg/kg) 给药, 每 3 d 1 次; DSS + 5-HT 组同时给予 1.0% DSS 和 5-HT。于造模第 6 天处死小鼠取结肠组织。通过结肠长度、疾病活动指数(DAI) 评分和 HE 染色等方法评估肠道炎症程度, 采用实时定量 PCR(RT-PCR) 检测小鼠结肠组织中白介素(IL)-1 β 、

IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 Duox2 mRNA 表达水平, 应用免疫组化检测结肠组织中 Duox2 蛋白的表达情况。结果 对照组和 5-HT 组小鼠无结肠炎表现; DSS(1.0%) 组小鼠表现为轻度结肠炎; DSS + 5-HT 组和 DSS(2.5%) 组有严重急性结肠炎表现。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等表达量随炎症程度加重而增加。Duox2 mRNA 在 5-HT 组和 DSS(1.0%) 组表达增高(均 $P < 0.05$), 在 DSS + 5-HT 和 DSS(2.5%) 组表达下调(均 $P < 0.05$)。免疫组化结果显示 Duox2 蛋白主要表达于小鼠结肠上皮刷状缘及上皮细胞胞质中, 与 mRNA 表达一致。结论 5-HT 可能通过影响 Duox2 的表达在小鼠结肠炎的发生发展中发挥作用。

关键词 结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 双氧化酶 2; 5-羟色胺; NADPH 氧化酶

中图分类号 R 574.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0337-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.007

2016-12-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81370487)

作者单位: 河南科技大学临床医学院, 河南科技大学第一附属医院

¹ 消化内科, ² 检验科, ³ 肝胆外科, 洛阳 471003

⁴ 首都医科大学附属北京康复医院消化内科, 北京 100114

作者简介: 董仕桢, 男, 硕士研究生;

高强, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gaoq@cemu.edu.cn

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性

logical mechanism. **Methods** Sixty Wistar mouse were selected. All the rats' teeth were complete dentition, no caries, normal occlusion. The rats were randomly divided into blank group, model group, Yang-xi group, Jia-che group, each group including 15 rats. The blank group: normal feeding and don't implement any intervention. The model group: made the acute pulpitis rats with opening sealing and put in lipopoly saccharides. The Yang-xi group: made the acute pulpitis rats, and sticking acupoint of the same side Yangxi point. The Jia-che group: made the acute pulpitis rats, and sticking acupoint of the same side Jiache point. The toothache point sticks were homemade. Immunohistochemistry was used to detect Notch1 protein and Notch2 protein expression in acute pulpitis rats at the first day, the third day and the fifth day. **Results** The Notch1 protein, at the first day that treated with toothache point stick, the blank group was lower expression than model group, Yang-xi group and Jia-che group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The third day, the model group was lower expression than Yang-xi group and Jia-che group, but higher than blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The fifth day, the blank group was lower expression than the other groups ($P < 0.01$). The Notch2 protein, at the first day that was treatment by toothache point stick, the Yang-xi group and Jia-che group were all higher expression than model group and blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The third day, the model group was higher expression than blank group, and the lower expression than Yang-xi group and Jia-che group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The fifth day, the blank group was lower expression than the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The toothache point stick can indirect improve dental pulp stem cells activity, through accelerating the speed of Notch signal protein impressed time. And it can improve the ability of self-repair after acute pulp injury.

Key words toothache point stick; acute pulpitis; Notch signaling proteins