

## 钠通道亚型 Nav1.3 在大鼠实验性牙髓炎组织中的表达

朱凌 胡媛平 许乐 阳宏林 蒋勇

**摘要** 目的 探讨钠通道亚型 Nav1.3 的表达与炎性疼痛之间的关系。方法 大肠杆菌内毒素(LPS)诱导大鼠牙髓炎后,在伤后 1、3、5 d 处死。取正常大鼠及牙髓炎大鼠牙髓组织,采用免疫组织化学法检测 Nav1.3 在牙髓炎牙髓组织的表达;Western blot 法检测 Nav1.3 的蛋白表达情况。结果 与正常大鼠牙髓组织相比,诱导牙髓炎后的大鼠牙髓的成牙本质细胞层中 Nav1.3 表达显著增强,免疫组化结果显示:正常组、实验 1、3、5 d 组的平均光密度分别为:0.263 1 ± 0.060 9、0.362 8 ± 0.061 0、0.524 9 ± 0.181 5、0.635 4 ± 0.216 0,实验组与对照组相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果显示:正常组、实验 1、3、5 d 组的 Nav1.3 蛋白表达量分别为:0.320 ± 0.041、0.551 ± 0.038、0.983 ± 0.027、1.142 ± 0.019,实验组与对照组相比,差异有统计学

意义 ( $P < 0.05$ )。结论 牙髓炎所致的炎性疼痛可导致 Nav1.3 蛋白表达显著上调,这可能是炎性疼痛发生时神经元细胞膜上钠通道功能异常的分子学基础之一。

**关键词** 电压门控钠离子通道;牙髓炎;牙痛

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0032-04

牙髓炎涉及剧烈的疼痛,牙髓中多种纤维的累积效应及其多种选择性直接影响牙痛的严重程度。成牙本质细胞神经元表达钠离子通道  $\alpha$  和  $\beta_2$  亚基,当发生牙髓炎引起炎性疼痛时,成牙本质细胞能够产生动作电位,其中电压门控钠离子通道具有至关重要的作用<sup>[1]</sup>。现对钠通道亚型 Nav1.3 在大鼠实验性牙髓炎牙髓中的表达情况进行研究,初步探讨 Nav1.3 与炎性疼痛之间的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 6月龄普通级 SD 大鼠 16 只,雄性 250 ~ 280 g,购自安徽医科大学实验动物中心。所有大鼠牙体、牙列完整,无龋坏、无牙齿畸形及牙

2013-08-12 接收

基金项目:安徽省科技厅年度项目(编号:12070403063)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院口腔预防医学教研室,合肥 230032

作者简介:朱凌,女,硕士研究生;

蒋勇,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: j6263@163.com

## Effects of umbilical cord blood stem cells on the treatment of type 1 diabetes in mice and its underlying mechanism

Zhang Weina<sup>1</sup>, Liu Shangquan<sup>1,2</sup>, Yuan Yuan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

<sup>2</sup>Central Laboratory, Binhu Hospital of Hefei City, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the effects of umbilical cord blood stem cells on the treatment of type 1 diabetes in mice, and explore the underlying mechanism. **Methods** Alloxan was used to build the model mice of type 1 diabetes, and the umbilical cord blood stem cells (0.1 ml/100 g weight) were injected through tail intravenous 5 days after the model was established. Radioimmunoassay was used to detect the serum insulin and C peptide level, pancreas islet function was evaluated through the OGTT experiment. HE staining was used to observe kidney and pancreas morphological characteristics, and Western blot and polymerase chain reaction (PCR) were used to test the expressions of PDX-1 and MafA. **Results** The blood glucose in the model mice increased significantly, and the level of serum insulin and C peptide decreased, and the expressions of PDX-1 and MafA reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the blood sugar level of the treatment group dropped, and the serum insulin and C peptide level increased ( $P < 0.01$ ), and insulin sensitivity improved. HE staining in the treatment group suggested the kidney and pancreas of mice morphological characteristics improved, PDX-1 and MafA expression were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Umbilical cord blood stem cells can improve the symptoms of type 1 diabetes in mice, reduce blood glucose, improve the pancreas islet function and target organ morphology in mice, and regulate PDX-1 and MafA. So it has a certain effect on the type 1 diabetes mice.

**Key words** umbilical cord blood stem cells; diabetes; PDX-1; MafA

周病, 咬合关系正常。于动物房喂食硬质鼠料, 动物饲养环境安静, 室温 20 °C 左右, 湿度 55% 左右, 混合饲料喂养, 自由饮水, 适应性饲养 1 周后进行实验。

**1.2 主要试剂** Nav1.3 多克隆抗体(以色列 Alomone 公司); 大肠杆菌内毒素(LPS, 美国 Sigma 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 二抗、免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);  $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Millipore 公司)。

**1.3 实验性牙髓炎动物模型的建立及分组** 将 16 只大鼠随机分为对照组、实验 1、3、5 d 组, 每组 4 只。生理盐水稀释 LPS 浓度至 5 g/L, 备用。实验组大鼠用 10% 水合氯醛(3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 取仰卧位, 固定大鼠四肢, 75% 酒精消毒双侧下颌中切牙, 用 1/4 钢钨球钻在齐牙龈缘处截断牙冠, 暴露穿髓孔, 使用扩大针能探及穿髓孔, 将浸润 LPS 的纸尖置于穿髓孔处后用普通玻璃离子暂封, 正常环境下饲养; 正常组大鼠不予处理, 常规饲养。

**1.4 动物行为学观察** 建立实验性牙髓炎动物模型后, 观察对照组、实验组大鼠的饮食二便、精神状态、体重等行为学变化。

**1.5 标本制备** 在预定时间点(伤后 1、3、5 d), 每组取 2 只大鼠称重后用 10% 的水合氯醛(3 ml/kg) 腹腔注射, 深度麻醉后心脏灌注生理盐水后继续灌注 4% 多聚甲醛, 灌注结束后取双侧下颌中切牙置于 10% 福尔马林中固定 48 h, 经 10% EDTA 脱钙液在常温下脱钙 3 个月, 脱水、透明、浸蜡、包埋, 沿牙齿长轴做厚度为 5  $\mu$ m 左右的连续切片 4 °C 保存, 切片用于 HE 及免疫组织化学染色。另每组取 2 只大鼠用于 Western blot 检测, 在预定时间点, 不需灌注直接颈椎脱臼处死, 取双侧下颌中切牙, 分离牙髓, 将牙髓置于放射免疫沉淀裂解液(SDS)中 -80 °C 冰冻保存备用。

**1.6 HE 及免疫组化法染色** 采用 HE 染色法检测正常组、实验 1、3、5 d 组大鼠牙髓炎的炎症情况, 对有炎症表达的实验 1、3、5 d 组以及正常组牙齿标本进行免疫组化 SP 染色。将石蜡切片在室温中放置 60 min 后 ① 常规脱蜡至水: 二甲苯中浸泡 15 min, 更换二甲苯(15 min); 无水乙醇(5 min); 95% 乙醇(5 min); 75% 乙醇中(5 min); 清水(5 min); ② 抗原修复: 将脱蜡后的切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0) 在微波炉内高火加热 5 min 至沸腾, 断电, 间隔 2 min 后, 反复加热 2 min 完成抗原修复。待切片自然冷却后滴加 3%  $H_2O_2$ , 37 °C 静置

10 min 后滴加正常山羊血清封闭液, 37 °C 孵育 30 min, 甩去多余液体, 再滴加 Nav1.3 多克隆抗体 50  $\mu$ l(稀释度为 1:100), 置于 4 °C 冰箱过夜; 次日 37 °C 复温 30 min, 经 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗 B 液(生物素化通用二抗工作液 B) 50  $\mu$ l, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗 C 液(辣根酶标记, 链霉卵白素工作液 C) 50  $\mu$ l, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 50  $\mu$ l DAB 显色液镜下观察显色 5 min, 自来水冲洗 3 min, 苏木精复染 3 min 后自来水冲洗 15 min, 脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。以 PBS 替代一抗作为阴性对照, 其余条件同上。结果用 Nikon eclipse 80i 成像系统拍摄(Nikon, 日本)并以 Image J 软件(1.44 版)对图像的平均光密度值进行分析。

**1.7 Western blot 检测** 将收集的 100 mg 牙髓组织加入 100  $\mu$ l SDS 缓冲液, 对牙髓组织样本进行裂解, 迅速研磨后在冰上进行组织匀浆, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液存放于 -80 °C 冰箱, 用 BCA 法测蛋白浓度。配置 12% SDS-PAGE 凝胶, 电泳条件为上层胶 80 V, 下层胶 100 V, 电泳结束后将胶上的蛋白质带转移至 PVDF 膜上(120 mA, 2 h 转膜), TBST 洗膜 1 次, 转印后的膜以脱脂奶粉封闭, 室温下孵育 3 h。以抗 -Nav1.3 单克隆抗体为一抗(稀释度为 1:200),  $\beta$ -actin 单克隆抗体为内参一抗(稀释度为 1:500), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 为二抗(稀释度为 1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后, 将 ECL 化学发光试剂均匀滴加于整张 PVDF 膜上反应 5 min, 暗室内用凝胶成像系统(Gel/Chem docprogram Quantity one, BioRad, 美国)进行检测。实验重复 3 次, 通过 Image J 软件分析化学发光图像获得蛋白表达水平。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间数据的比较采用多因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 动物一般行为学特点** 所有大鼠在观察期间无死亡。正常组大鼠饮食二便正常, 精神状态较好; 实验 1 d 组大鼠在造模后反复舔伤口, 不敢咬食物, 大鼠烦躁不安, 体重变化不大; 实验 3 d 组大鼠在造模后烦躁不安, 尖叫不止, 反复舔伤口, 不敢咬食物, 粪便量明显减少, 体重降低; 实验 5 d 组大鼠在造模后, 躁动不安, 几乎未进食, 少量饮水, 明显消瘦, 体

重降低较多。

2.2 HE 染色观察炎症程度 HE 结果显示: 正常组的组织结构正常, 无病理性改变 (图 1A); 实验 1 d 组的组织中出现少量中性粒细胞浸润, 成牙本质细胞排列轻度紊乱, 血管轻度扩张 (图 1B); 实验 3 d 组的组织呈急性炎症渗出反应, 牙髓组织充血、水肿、渗出明显, 可见大量中性粒细胞浸润, 成牙本质细胞排列紊乱 (图 1C); 实验 5 d 组的组织中可见大量中性粒细胞浸润, 血管扩张充血明显, 呈树枝状, 病变周围成牙本质细胞层严重紊乱、变性 (图 1D)。结果提示实验性牙髓炎动物模型造模成功。

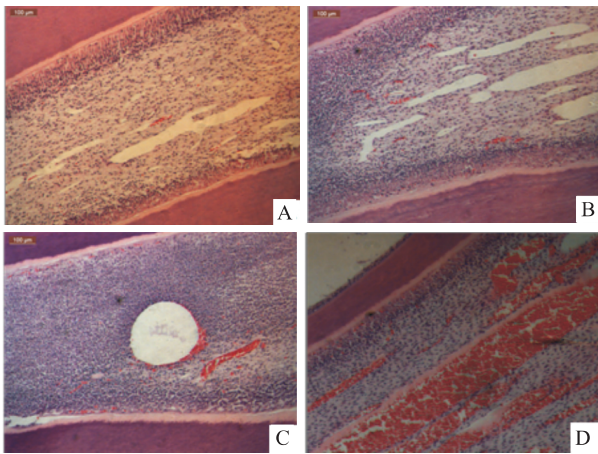


图 1 正常组及实验组大鼠牙齿标本的病理状态 HE × 100  
A: 正常组; B: 实验 1 d 组; C: 实验 3 d 组; D: 实验 5 d 组

2.3 免疫组化检测 Nav1.3 的表达 免疫组化 SP 法染色结果显示: Nav1.3 在正常组大鼠牙髓的成牙本质细胞层表达非常少, 随着牙髓炎的严重程度增加, Nav1.3 在实验 1 d 组牙髓的成牙本质细胞层中散在少量表达; 实验 3 d 组牙髓的成牙本质细胞层中 Nav1.3 的阳性表达增强; 实验 5 d 组牙髓的成牙本质细胞层中表达显著增强。见图 2。正常组、实验 1、3、5 d 组的平均光密度分别为:  $0.2631 \pm 0.0609$ 、 $0.3628 \pm 0.0610$ 、 $0.5249 \pm 0.1815$ 、 $0.6354 \pm 0.2160$  实验组与对照组相比, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.4 Western blot 检测 Nav1.3 的表达 Western blot 结果显示正常组 Nav1.3 蛋白的表达量明显低于实验组 随着炎症程度的增加, Nav1.3 蛋白的表达量逐渐增加, 正常组、实验 1、3、5 d 组的 Nav1.3 蛋白表达量分别为:  $0.320 \pm 0.041$ 、 $0.551 \pm 0.038$ 、 $0.983 \pm 0.027$ 、 $1.142 \pm 0.019$ , 实验组与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

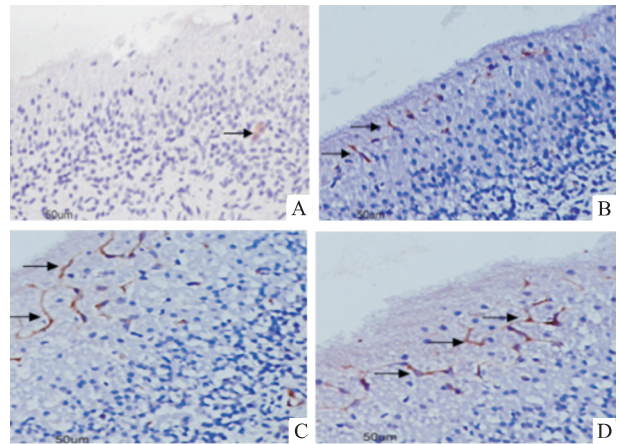


图 2 正常组及实验组大鼠牙髓 Nav1.3 的表达情况 SP × 200  
A: 正常组; B: 实验 1 d 组; C: 实验 3 d 组; D: 实验 5 d 组; 图中棕黄色染色为免疫组化染色阳性 (箭头)

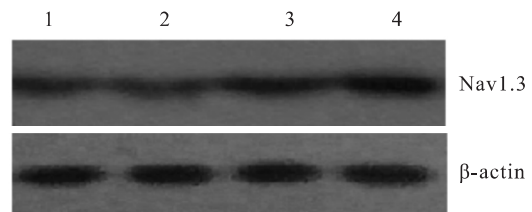


图 3 正常组与实验组 Nav1.3 蛋白的表达情况  
1: 正常组; 2: 实验 1 d 组; 3: 实验 3 d 组; 4: 实验 5 d 组

### 3 讨论

牙髓受来自三叉神经节的纤维支配, 在病理状态下可产生痛觉反应, 其疼痛程度涉及许多纤维的累积效应<sup>[1]</sup>。牙髓伤害性感受器的传入放电频率和疼痛程度之间有很强的相关性<sup>[2]</sup>。已有学者通过膜片钳与基因转录分析证明培养的人成牙本质细胞表达神经组成的钠通道, 成牙本质细胞能够产生动作电位<sup>[3]</sup>, 钠离子通道存在于神经轴突与成牙本质细胞接触的部位, 钠通道的聚集可降低动作电位发生的阈值, 将痛觉冲动传输至中枢神经系统<sup>[4]</sup>, 产生痛觉。由此可见, 钠通道可能参与了牙髓炎疼痛感觉的发生过程。钠通道不同的亚型各自分布在神经系统的特定区域, 并呈现不同的电生理特性<sup>[5]</sup>。

本研究中, 大鼠的行为特征提示伴随牙髓炎症的加重, 疼痛程度逐渐增加; 免疫组化法以及 Western blot 法检测诱导大鼠实验性牙髓炎 1、3、5 d Nav1.3 在牙髓中的表达情况, 结果显示: Nav1.3 的蛋白水平均在牙髓出现炎症引起疼痛后上调, 疼痛程度越重, Nav1.3 蛋白的上调水平越显著, 与相关文献<sup>[6]</sup>在炎症疼痛相关模型中的发现相似。因此, 笔者推测牙髓炎后 Nav1.3 表达上调很可能提高了

成牙本质细胞的兴奋性,诱导动作电位的产生,是牙髓炎产生疼痛的重要机制。

研究<sup>[7]</sup>表明,与正常牙髓相比,发炎的牙髓神经的麻醉传导速度明显降低,但是发炎牙髓神经的麻醉响应强度及速度明显增高;同时局麻药的应用往往难以抑制炎症牙髓疼痛的传输<sup>[8]</sup>,这与临床上急性牙髓炎患者应用局麻药物效果不佳相一致。近年来,局麻药物已发展成为普鲁卡因、利多卡因和布比卡因等,可以提供强大的镇痛作用,其原因是这些化合物阻塞了电压门控钠通道。当局部麻醉药发挥作用时,使钠离子通道处于静止状态,从而防止动作电位的进一步传播<sup>[9]</sup>。

Nav1.3 异构体可能在牙髓炎局部麻醉失败的调控中发挥作用,本研究表明,牙髓炎导致炎性疼痛时,Nav1.3 表达上调,增加了神经元的兴奋性,可降低局麻药物的灵敏度。在临床治疗牙髓炎患者的炎性疼痛时,钠通道 Nav1.3 可以产生快速激活的电流,快速从失活状态恢复,还可以加速复活对河豚毒敏感的钠电流,涉及静息膜电位、痛觉过敏和动作电位时程。有研究<sup>[10]</sup>表明钠通道表达的变化与牙髓感觉神经电流的变化密切相关,Nav1.3 可能成为新型麻醉药的潜在目标。

综上所述,诱导大鼠实验性牙髓炎产生炎性疼痛后可导致 Nav1.3 蛋白表达显著上调,钠通道 Nav1.3 可以产生快速激活的电流,快速从失活状态恢复,还可以加速复活对河豚毒敏感的钠电流,因此,牙髓炎导致炎性疼痛时,Nav1.3 表达上调很可能参与了成牙本质细胞的兴奋性反应。

## Expression of sodium channel subtypes Nav1.3 in experimental pulpitis in rats

Zhu Ling, Hu Yuanping, Xu Le et al

(School of Stomatology Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the relationship between Nav1.3 expression level and dental pain. **Methods**

The experimental pulpitis model was established in adult male Sprague Dawley rats by using *E. coli* LPS. The expression of Nav1.3 in normal dental pulps in rat and painful pulp tissues in rats at 1, 3, 5 d were measured using immunohistochemistry and Western blot. **Results** The expression level of Nav1.3 increased significantly in painful dental pulps in rats in comparison with normal dental tissues in rats. The immunohistochemistry results revealed that Nav1.3 expression level in normal dental issues in rats and painful pulp tissues in rats at 1, 3, 5 d was  $0.6354 \pm 0.2160$ ,  $0.3628 \pm 0.0610$ ,  $0.5249 \pm 0.1815$ ,  $0.6354 \pm 0.2160$  respectively ( $P < 0.05$ ). Western blot showed similar results of  $0.320 \pm 0.041$ ,  $0.551 \pm 0.038$ ,  $0.983 \pm 0.027$ ,  $1.142 \pm 0.019$ . **Conclusion** Pulpitis can cause significant up-regulation of Nav1.3 protein, which may be related to the molecular mechanism of functional alternation of sodium channels.

**Key words** voltage-gated sodium channels; pulpitis; toothache

## 参考文献

- [1] Magloire H, Maurin J C, Couble M L, et al. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses [J]. *J Orofac Pain*, 2010, 24(4): 335-49.
- [2] Luo S, Perry G M, Levinson S R, et al. Nav1.7 expression is increased in painful human dental pulp [J]. *J Mol Pain*, 2008, 4(16): 1-13.
- [3] Allard B, Magloire H, Couble M L, et al. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts possible role in tooth transmission [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 29002-10.
- [4] 杨晨颖, 王克威. 电压门控钠通道 Nav1.7 与痛信号的产生 [J]. *生理科学进展*, 2007, 38(4): 351-4.
- [5] Krafft D S, Bannon A W. Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities [J]. *J Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(1): 50-6.
- [6] Henry M A, Luo S J, Rzasa R S, et al. Sodium channel expression and localization at demyelinated sites in painful human dental pulp [J]. *J Pain*, 2009, 10(7): 750-8.
- [7] Modaresi J, Dianat O, Soluti A. Effect of pulp inflammation on nerve impulse quality with or without anesthesia [J]. *J Endod*, 2008, 34(4): 438-41.
- [8] Warren C, Mok L, Gordon S, et al. Quantification of neural protein in extirpated tooth pulp [J]. *J Endod*, 2008, 34(1): 7-10.
- [9] Arcisio-Miranda M, Muroi Y, Chowdhury S, et al. Molecular mechanism of allosteric modification of voltage-dependent sodium channels by local anesthetics [J]. *J Gen Physiol*, 2010, 136(5): 541-54.
- [10] Wells J E, Bingham V, Rowland K C, et al. Expression of Nav1.9 channels in human dental pulp and trigeminal ganglion [J]. *J Endod*, 2007, 33(10): 1172-6.