

# 骀创伤对大鼠实验性牙周炎影响的研究\*

胡友德 汪建中

(江西省人民医院 南昌 330006)

**摘要:**目的:建立 SD 大鼠骀创伤及牙周炎的实验性动物模型,分析骀创伤在大鼠实验性牙周炎发生发展中的作用。方法:将 96 只 SD 大鼠随机分为四组:空白对照组(A组)、骀创伤组(B组)、牙周炎组(C组)、骀创伤与牙周炎复合组(D组)。A组不做任何处理,常规饲料喂养;B组于左侧上颌第一磨牙骀面正中植入一自攻自断螺钉并用牙釉质粘合树脂加固,常规饲料喂养;C组不做任何处理,用 Keyes2000 牙周炎饲料加自身粪便水喂养;D组处理同 B 组,用 Keyes2000 牙周炎饲料加自身粪便水喂养。各组分别于术后 1、4、8、12 周随机处死 6 只,取左侧下颌磨牙区组织块固定,常规制备左侧下颌第一磨牙、牙龈、牙槽骨的颊舌向石蜡切片,HE 染色。光镜下观察左侧下颌第一磨牙的牙周组织病理变化情况。结果:(1)A 组整个实验期间无变化。B 组和 D 组 1 周时牙周膜病变明显,表现为牙周膜玻璃样变、出血、增宽,牙槽骨吸收明显,破骨细胞数比 A 组同期明显增高( $P < 0.05$ )。(2)B 组 4 周时牙周膜病变减轻,出血减少,牙槽骨以成骨为主,牙槽骨束状增生;8 周时牙周膜间隙增宽或变窄,吸收处大多有牙骨质修复或牙骨质增生;12 周时根外吸收均被牙骨质修复,根尖骨质增生。(3)D 组 4 周时牙龈沟上皮溃疡,固有层有较多的淋巴细胞和巨噬细胞浸润,纤维排列紊乱,牙槽嵴处破骨细胞较多,比 C 组同期明显增高( $P < 0.05$ )。(4)D 组 8 周时牙龈沟上皮溃烂明显,固有层和牙周膜中均有大量淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞,牙周膜纤维粗细不均或断裂,牙槽嵴处破骨细胞比 4 周时明显增多( $P < 0.05$ );牙槽嵴高度降低,与 4 周时相比有显著性差异( $P < 0.05$ );12 周时典型牙周炎表现,牙槽嵴处大量破骨细胞,呈潜掘性骨吸收,牙槽嵴高度明显降低。D 组 8 周时和 12 周时破骨细胞数、牙槽嵴高度降低值与 C 组同期有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论:骀创伤对牙周组织影响的变化规律是由病变到修复到适应的过程,骀创伤作为局部因素加快加重牙周炎的发生发展。

**关键词:**大鼠;骀创伤;牙周炎;破骨细胞

中图分类号:R 781.4

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.04.002

骀创伤是指由于异常的咬合关系超过了牙周适应及修复能力,造成牙周附着器的损伤,使咀嚼体系出现病理性损害和适应性改变。骀创伤不仅造成牙周组织的损伤,还能引起牙髓、颞下颌关节及其他相关组织的损伤<sup>[1-2]</sup>。正常的咬合力对牙周组织是一种功能性刺激,对于保持牙周组织的正常代谢和结构状态是必需的。生理情况下,当咬合力增加时,牙周膜增厚,牙周纤维束增多,牙槽骨密度也增加。但当咬合力超过牙周组织的承受力时,便能造成牙周组织的损伤,可使牙周纤维破坏,牙槽骨吸收,牙骨质损坏并停止新生,导致牙松动<sup>[3-4]</sup>。以往对骀创伤和牙周炎的研究大部分是临床观察与资料总结,因临床取材困难,不能深入进行研究,因此,近年来许多研究者转向了实验性动物模型研究<sup>[5]</sup>。本试验拟建立骀创伤对 SD 大鼠实验性牙周炎发生影响的动物模型,分析骀创伤在大鼠实验性牙周炎发生发展中的作用,对临床上骀创伤和牙周炎的防治具有一定的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、仪器和材料

1.1.1 动物 8 周龄健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠 96 只,雌雄各半,体重 200~280 g,普通级,由南昌大学医学院动物科学部提供。除 A、B 两组用常规标准混合饲料喂养,C、D 两组用 Keyes2000 牙周炎饲料加自身粪便水喂养外,其他喂养条件相同。

1.1.2 实验仪器 ZP-12P 生物组织自动脱水机,亚

光 YB-6LF 组织包埋机,电热恒温水浴锅,LEICA RM2135 组织切片机,otic Med 6.0 数码医学图像分析系统。

1.1.3 实验材料 Keyes2000<sup>®</sup>牙周炎饲料(果糖 56%、脱脂奶粉 28%、面粉 6%、酵母 4%、苜宿榆 3%、动物肝粉 1%、食盐 2%、少量蔬菜)南昌大学动物科学部配制;牙釉质粘合树脂,天津市合成材料工业研究所;牙用自攻自断螺钉,杭州西湖生物材料有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 参照随机数字表法将 96 只 SD 大鼠染色后随机分为四组,空白对照组(A组)、骀创伤组(B组)、牙周炎组(C组)、骀创伤与牙周炎复合组(D组)。A组不做任何处理,常规标准混合饲料喂养;B组于左侧上颌第一磨牙骀面正中植入一自攻自断螺钉并用牙釉质粘合树脂加固,常规标准混合饲料喂养;C组不做任何处理,用 Keyes2000 牙周炎饲料加自身粪便水喂养;D组处理同 B 组,用 Keyes2000 牙周炎饲料加自身粪便水喂养。每组 24 只,雌雄各半,体重 200~280 g。

1.2.2 大鼠骀创伤动物模型的建立 麻药配制:0.1 g 苯巴比妥钠粉剂加 10 mL 生理盐水,混匀,配成 1%苯巴比妥钠溶液,苯巴比妥钠粉剂和生理盐水由江西省人民医院药房提供。腹腔注射:选择 B、D 两组大鼠,一人抓住大鼠(先称好重量),使其腹部向上,另一人将装有 1%苯巴比妥钠注射器的注射针

\*2011 年江西省自然科学基金课题(基金号:20114BAB205067)

头于右下腹部刺入皮下,使针头向前推 0.5~1.0 cm,再以 45° 角穿过腹肌,固定针头,缓缓注入药液(120 g 体重注射 1 mL 麻药),为避免伤及内脏可使动物处于头低位,使内脏移向上腹。植入自攻自断螺纹钉:大鼠麻醉后,将大鼠四肢捆绑于手术台上,使腹部向上,打开无影灯,用自制开口器使大鼠口腔打开,用自制的口镜拉开左侧口角,暴露左侧上颌第一磨牙,用碘伏消毒,在左上颌第一磨牙骀面中央窝处用直径 1 mm 金钢砂石车针钻孔,孔深 1.5 mm,再将 1.2 mm 直径的自攻自断螺纹钉用慢速手机打入孔内,使螺纹钉高出骀面 0.6~0.8 mm,并用牙釉质粘合树脂骀面加固,造成左下颌第一磨牙骀创伤。稍后将大鼠处于伏位,并用无影灯照射使其回暖。将所有 B、D 两组大鼠都做同样处理。

1.2.3 标本提取和组织切片的制作 各组分别于实验开始后 1、4、8、12 周用脊髓拉断法处死,每组每次随机处死 6 只,雌雄各半,处死时间均选择为 8:00~12:00。处死后分离左侧下颌第一磨牙区带牙龈和牙槽骨的组织块,放入一 Eppendorf 管内,管壁外编号标记,管内加入 4% 多聚甲醛固定 48 h。7% EDTA 4 °C 脱钙 60 d,取出标本修整,酒精系列脱水,石蜡整体包埋,重新编号。包埋方向处于第一磨牙颊舌向;连续切片,厚度 5 μm,HE 染色。以上操作由同一人完成。

1.2.4 观察结果与数据采集 利用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统低倍下选择有第一磨牙颊舌向最大切面的切片作为有效切片。仔细观察每一张切片上第一磨牙牙龈、牙周膜、牙槽骨的病理变化,记录每一张切片的观察结果。对牙根牙槽骨表面破骨细胞进行计数,破骨细胞指位于锯齿状边缘的破骨陷窝内或牙槽骨表面的多核嗜酸性巨细胞(核多于 2 个)。随机选 5 个视野(× 400),将所得结果求平均值。测量牙槽嵴高度与釉牙骨质界到根尖距离的比值,测量方法是以牙槽嵴顶点在牙根表面的投影到根尖的距离除以釉牙骨质界到根尖的距离,分 3 次测量求平均值。

1.2.5 统计处理 结果用 SPSS12.0 进行统计学处理,所检测的两个数值型指标分布呈正态分布采用( $\bar{X} \pm S$ )进行统计描述。同一组内 4 个不同时间点及同一时间各实验组间的指标对比如满足正态、方差齐则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较用 LSD 法,否则非参数检验方法。

## 2 结果

2.1 破骨细胞数 见表 1。组内分析:A 组在不同时间破骨细胞数没有变化,差异无统计学意义( $P$

$>0.05$ );B 组在第 1 周明显增高,随后明显降低,差异有统计学意义( $F=117.222, P < 0.05$ );C、D 两组随时间延长而明显增高,差异有统计学意义( $F=153.333, P < 0.05$ )。组间分析:第 1 周时,B 组与 D 组破骨细胞数明显高于其他两组,差异均有统计学意义;从第 4 周到第 12 周,C、D 两组与 A、B 两组的差异明显增大,差异有统计学意义( $F=230.504, P < 0.05$ );D 组明显高于 C 组,差异均有统计学意义;在第 12 周时,A 组与 B 组比较差异无统计学意义。

表 1 各组不同时间的破骨细胞数 ( $\bar{X} \pm S$ ) 个

组别	n	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
A 组	6	0.167± 0.408	0.167± 0.408	0.167± 0.408	0.167± 0.408
B 组	6	6.833± 0.753	1.500± 0.548	1.167± 0.408	0.667± 0.817
C 组	6	1.167± 0.408	4.667± 0.817	7.167± 0.753	9.000± 0.632
D 组	6	6.833± 0.753	8.500± 0.548	10.667± 0.816	12.333± 0.516

2.2 牙槽嵴与釉牙骨质界到根尖距离的比值 见表 2。组内分析:A、B 两组牙槽嵴高度降低不明显,差异无统计学意义;C、D 两组随时间延长而明显降低,差异有统计学意义( $F=153.333, P < 0.05$ )。组间分析:A、B 两组无明显差异,C 组比 A、B 两组降低明显,而 D 组又比 C 组降低明显,两两比较差异均有统计学意义。

表 2 各组不同时间的牙槽嵴与釉牙骨质界到根尖距离的比值 ( $\bar{X} \pm S$ )

组别	n	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
A 组	6	0.808± 0.008	0.803± 0.006	0.797± 0.011	0.794± 0.006
B 组	6	0.802± 0.005	0.795± 0.011	0.794± 0.009	0.792± 0.006
C 组	6	0.803± 0.010	0.722± 0.015	0.703± 0.006	0.558± 0.007
D 组	6	0.806± 0.007	0.693± 0.006	0.563± 0.007	0.495± 0.008

## 3 讨论

牙周炎动物模型建立的方法有很多种。Caillon P<sup>[7]</sup>等用高糖饲料 Keyes2000 喂养地鼠,6 周后,形成实验性牙周炎。杨新雪<sup>[8]</sup>报道以高糖食谱加粪便水饲养大鼠 7 周可见牙周炎改变。Kuhr 等用牙颈部丝线结扎法结扎大鼠上颌第二磨牙颈部,发现明显的骨丧失发生在最初的 15 d 内。Chang KM<sup>[9]</sup>等用接种特异菌法发现单一注射牙龈卟啉菌口腔接种能够于 6 周后诱导大鼠实验性牙周炎的发生。Ichie YM<sup>[10]</sup>等研究发现,单一致病菌能够诱导实验性牙周炎,但多种致病菌的协同作用可加重病情进展的疾病的严重性。Dumitrescu AL<sup>[11]</sup>等通过在 Wistar 大鼠下颌第二磨牙牙龈内单独注射脂多糖 LPS 10 μg/μL,结果证明在大鼠龈下注射 LPS 可以提供一个简单的、具有可重复性的而且与人牙周炎特征相似的实验性牙周炎动物模型。以上牙颈部丝线结扎法、接种特异菌法、注射脂多糖法实验本身对实验牙牙周造成直接创伤,而高糖饲料法对实验牙牙周不直接产生破坏,仅表现为骀创伤。所以,为了尽可能减少实验本身的干扰,本实验采用 Keyes2000 高糖饲料加粪便水喂养的方法造成牙周炎动物模型。

在动物模型的磨牙上制造咬骀高点,诱导对骀

产生实验性殆创伤,是多数学者采用的实验方法<sup>[12]</sup>。一般在动物模型的磨牙上放置金属冠套帽、金属殆面板、塑料殆垫、树脂突、固位钉等。还有的学者将动物模型的一侧上颌磨牙全部拔除,使其丧失咬殆力来增强对殆牙咬殆力,达到造成殆创伤的目的。动物模型造成创伤的高度可直接影响实验的效果,Asazuma Y<sup>[13]</sup>等实验证明,0.6~0.8 mm 为较理想的殆创伤高度。这可能是 0.6 mm 以下的数值处于牙齿的生理活动范围之内,不容易造成殆创伤,而高度超过 0.8 mm 容易造成牙齿劈裂。所以本实验选择 0.6~0.8 mm 作为造成殆创伤的高度。

本实验 B 组单纯殆创伤对牙周组织的影响在第 1 周表现为牙周膜玻璃样变、疏松水肿、出血、增宽和破骨细胞数明显增高,破骨细胞数明显高于 A 组和 C 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明殆创伤在初期对牙周组织破坏明显;B 组到第 4 周以后,牙周膜病变的发生降低,出血减少,破骨细胞数降低( $P < 0.05$ ),成骨细胞数增多,牙槽骨以成骨为主,牙槽骨束状增生,8 周时牙周膜间隙增宽或变窄,吸收处大多有牙骨质修复或牙骨质增生;12 周时根外吸收均被牙骨质修复,根尖骨质增生。说明到第 4 周以后殆创伤的影响降低,牙周组织开始修复过程。所以我们认为,牙周组织变化规律是由病变到修复到适应的过程。这一结果与 Budtz-Jorgensen E.<sup>[14]</sup>、史玉斌<sup>[9]</sup>等人报道的结果相似。C 组破骨细胞数随时间延长而呈递增态势,牙槽嵴高度的降低随时间延长也更趋严重,且不同时间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),这说明 C 组牙周骨组织随时间延长表现出进行性破坏过程。D 组 1 周时破骨细胞数明显高于 A 组和 C 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),D 组 4 周时牙龈沟上皮溃疡,固有层有较多的淋巴细胞和巨噬细胞浸润,纤维排列紊乱,牙槽嵴处破骨细胞较多,8 周时牙龈沟上皮溃烂明显,固有层和牙周膜中均有大量淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞,牙周膜纤维粗细不均或断裂,血管腔隙增多,牙槽嵴处破骨细胞比 4 周时明显增多,牙槽嵴高度明显降低,12 周时牙周炎表现更典型,牙槽嵴处大量破骨细胞,呈潜掘性骨吸收;C 组同期的表现比 D 组症状较轻。D 组第 1 周时破骨细胞数增高,到第 4 周时没有出现降低而是继续增高( $P < 0.05$ ),牙槽嵴高度的降低也随时间延长而降低明显( $P < 0.05$ ),而且 D 组每一时间段破骨细胞数的增加和牙槽嵴高度的降低都比 C 组同期明显( $P < 0.05$ ),牙周炎症状也更严重。这些说明殆创伤加重加快了牙

周炎的发生发展。但是本实验单纯性牙周炎出现的时间在第 4 周以后,这与有关文献报道的结果不尽相同。Caillon P 等用高糖饲料 Keyes2000 喂养地鼠,6 周后形成实验性牙周炎;Escartin Q 等报道给予 6 周龄雄性金黄地鼠以 Keyes2000 牙周炎饲料 12 周后诱导出牙周炎。本实验 Keyes2000 牙周炎饲料由南昌大学动物科学部配制,形态为椭圆形小块状,而国外 Keyes2000 高糖饲料一般配制为粉末状或浓汤型。因此,结果的不同可能与动物的种类与大小、饲料配制及饲料的形态和喂养方法不同有关。本实验 A 组第 8 周和第 12 周牙槽嵴高度比第 1 周有所降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),B 组第 12 周牙槽嵴高度比第 1 周有所降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),这种差异可能与大鼠牙根和牙槽骨的生长发育不同而造成牙槽嵴相对降低有关。

#### 参考文献

- [1]刘洪臣.早期咬合创伤性牙痛的临床初步分析[J].口腔颌面修复学杂志,2002,3(1):15-17
- [2]Grinin Vm.The Concept of the pathogenesis of occlusive disorders indiseases of the temporomandibular joint [J].Stomatologia,1995,74:29-32
- [3]史玉斌,王嘉德,曹采方.殆创伤性牙髓炎和根尖周炎的临床观察[J].中华口腔医学杂志,1997,45(1):231
- [4]岳松龄.口腔内科学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,1986.256
- [5]杨少强,廖旭辉,谢水林.牙周炎动物模型实验性的研究[J].国际医药卫生导报,2004,10(14):10-11
- [6]Keyes PH,Jordan HV.Periodontal lesions in the syrian hamster III. findings related to an infectious and transmissible component [J]. Arch Oral Biol,1964,9:377-400
- [7]Caillon P,Saffar JL.Improvement of gingival and alveolar bone status in periodontitis-affected hamsters treated with 15-methyl prostaglandin[J].Periodont Res,1994,29:138
- [8]杨新雪,全月华,张举之,等.牙周炎的动物模型研究[J].实用口腔医学杂志,1990,6(1):6-8
- [9]Chang KM,Ramamurthy NS,Mcnamara TF,et al.Tetracyclines inhibit porphyromonas gingivalis induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism[J].J Periodont Res,1994,29:242
- [10]Ichie YM,Suzuki A,Kawabata K,et al.Alveolar bone loss in rats infected with a strain of prevotella intermedia and fusobacterium nucleatum isolated from a child with prepubertal periodontitis [J].J Periodont,1997,68:12
- [11]Dumitrescu AL,Abd-El-Aleem S,Morales-Aza B,et al.A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption,osteoclast activity,and local peptidergic innervation [J].J Clin Periodontol, 2004,31(8):596-603
- [12]刘飞,李明哲,赵云凤,等.咬殆力增强对大鼠磨牙 PDL bFGF 表达的影响[J].现代口腔医学杂志,2001,15(1):31
- [13]Asazuma Y,Isogai Y,Watanabe K,et al.Changes in gnathosoma and tooth contact characteristics induced by experimental occlusal interferences created using a full-cast double crown [J].Oral Rehabil, 1995,22(3):203-211
- [14]Budtz-Jorgensen E.Occlusal dysfunction and stress.An experimental study in macaque monkeys[J].J Oral Rehabil,1981,8(1):1-9

(收稿日期: 2012-05-14)