

牙周炎动物模型的研究进展*

黄镜静 谭颖徽[△]

(第三军医大学新桥医院口腔科 重庆 400037)

摘要 牙周炎是常见的口腔慢性疾病,是造成中国成年人失牙的最重要原因。为进一步探讨牙周炎的发病机制、病理学特点,以便更好的制定治疗方案,动物模型被广泛应用。本文从牙周炎动物模型建立方法和实验动物的选择等方面,对牙周炎动物模型的研究进展做一综述。

关键词 牙周炎 动物模型

中图分类号 R781.42 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)05-992-03

The Progress of Periodontitis Animal Model*

HUANG Jing-jing, TAN Ying-hui[△]

(Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

ABSTRACT: Periodontitis is a common oral chronic disease, which has been confirmed to be the most important reason for tooth loss in adults. To further explore the pathogenesis, pathological characteristics and treatment plan of periodontitis, animal model have been widely used. This paper introduces the establishment methods of periodontitis animal model and the selection of experiment animal recently.

Key words: Periodontitis; Animal model

Chinese Library Classification(CLC): R781.42 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)05-992-03

牙周炎是发生在牙齿支持组织的炎症破坏性疾病,是口腔科的多发病和常见病,为了深入研究其病因、发生发展、宿主免疫反应及诊断治疗等,需要建立一个稳定、可靠、能够真实模拟人类牙周炎发病情况的动物模型。

1 牙周炎的发病机制

牙周炎是细菌及其产物引起的慢性感染性疾病,并引起宿主的免疫应答和炎症反应,造成牙周组织的直接和间接破坏。牙菌斑虽是牙周炎的始动因子,但少量菌斑可由机体的防御机能所控制,在细菌侵袭和宿主防御之间维持动态的生态平衡,仍可保持牙周组织的健康^[1]。当牙周微生物与宿主之间在质和量方面失衡时,就会引起口腔菌群生态紊乱,即以牙周炎症为主的病理过程,其中,全身因素可影响局部因素引起的组织反应。因此若能在局部和全身因素共同作用下,牙周炎的发生发展则更为显著,建立实验性牙周炎动物模型亦更加快速有效^[2]。

2 实验动物的选择

选择动物是牙周炎实验研究和临床研究的基础,所选用的动物不仅要与人类牙周组织结构、病理改变相似,且要形体适中、经济易得便于实验。牙周炎的形态学评价主要包括牙龈的外形、色泽、质地,牙周探诊深度,龈沟出血指数,菌斑指数和组织病理学观察等。理论上讲,动物越高等,其解剖特征、生理及病理表现就与人类越相似,各项病变指标与人类疾病指标越接近,动物模型的研究价值也就越高。但是,高等动物通常价格较

贵,繁殖较慢,且属国家自然保护动物,不易购买,难以进行大规模的实验研究。为此,构建一种快速、简单、有效且实用的动物模型显得尤为重要。

牙周炎的易感动物种属很多,通常可选用大鼠、金黄地鼠、田鼠、豚鼠、家养雪貂、羊、小型猪^[3]、狗及非人灵长类(如猴等)动物。其中猴、狗、鼠较常用于牙周炎动物模型的建立^[4,5]。

猴为非人灵长类动物,且牙式与人完全相同,其牙体和牙周解剖、组织病理学、口腔微生物学及免疫学等,都与人类有极相似之处,因此,猴是牙周病研究的首选动物。但由于经济和伦理等原因,其使用较为受限。

狗的牙周组织结构、牙周病流行病学及组织病理学与人类亦极为相似,也有乳牙和恒牙两副牙列,其牙面上常有牙石沉积,尖牙、前磨牙的牙间隙宽,且价格适中,容易控制,是用于建立实验性牙周炎模型较理想的动物。

大鼠口腔菌斑的形成也与人类较为相似,除了其切牙终生不断生长,无法研究外,大鼠磨牙牙周组织结构、组织病理都与人类近似,其主要优点是价格便宜,易于饲养,且成活率高。因此,在牙周病的研究中,大鼠一直是最广泛使用的啮齿动物^[6]。

兔口腔中的病原微生物也很丰富,如核梭杆菌,解肝素普氏菌,普雷沃菌属,米勒链球菌,衣氏放线菌,溶血隐秘杆菌等多种细菌,其菌群种类与人类牙周疾病的感染源分布相似,因此,应用兔建立牙周炎模型较为接近人类牙周疾病的真实状态。

* 基金项目:军队医药卫生科研基金项目课题(No.06MA184)

作者简介:黄镜静(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:高原牙周病,E-mail:jing137@sina.com

[△]通讯作者:谭颖徽,Tel:023-68755632,E-mail:tanyh1962@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-07-30 接受日期:2011-08-23)

3 实验性牙周病动物模型的建立

3.1 单纯局部结扎法

结扎线法是目前较为成熟且被广泛应用的建立牙周炎动物模型的方法,其容易造成菌斑的持续积聚、炎症细胞的持续浸润,从而造成牙周支持组织破坏和牙槽骨吸收^[7]。此方法操作简单,能在短期内造成牙周炎。主要的结扎材料有细丝线、尼龙线、棉线、正畸用钢丝等。用丝线结扎造成大鼠牙周炎是目前公认的牙周炎动物模型之一。最早的牙周炎模型为1979年Marikova等^[8]利用在鼠牙颈部结扎丝线诱导而成。Di Paola等^[9]通过在大鼠下颌左侧第一磨牙的牙颈部结扎2-0的丝线,8天后切取丝线结扎部位的牙及牙周组织进行组织学分析,发现牙槽骨吸收及较多的炎性细胞浸润。Achong等^[10]在大鼠的上颌第二磨牙颈部结扎丝线,第7天后出现急性炎症,伴有上皮溃疡,中性粒细胞浸润,结缔组织崩解,并出现根面吸收。第21天时,结合上皮根向迁移,大体及放射线观察均见第二磨牙牙周有中到重度的水平型牙槽骨吸收,提示造模成功。Bezerra等^[11]用尼龙线结扎于Wistar大鼠双侧上颌第二磨牙颈部,并在前庭处打结。发现第4天时开始出现牙槽骨丧失,第7天时达到高峰。组织病理学观察显示第一、第二磨牙区进展性单核细胞浸润,破骨细胞数目增加,并有严重的牙骨质和牙槽骨吸收。Kuhr等^[12]用5-0丝线结扎于大鼠上颌第二磨牙颈部,发现15天时牙槽骨丧失明显,达200-300 μm,以后骨丧失逐渐减轻。因此认为,明显的骨丧失发生在最初的15天内。此种方法通过机械物理法人为造成牙周组织破坏,适用于较长时间内观察牙周炎的病程进展,方便有效^[13,14]。

3.2 接种致病菌法

单纯在口腔及牙龈缘部接种牙周炎致病菌也可建立牙周炎动物模型。Schreiner等^[15]用野生型伴放线放线杆菌(Aa)接种于大鼠食物中建立了牙周炎模型,这样定植在口腔的过程更接近于自然的感染过程,而通过直接注射或局部涂抹细菌建立的模型,缺乏疾病的初级阶段。内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的脂多糖(LPS)成分,对牙周组织有很高的毒性,被认为是牙周炎症的重要病因之一。Dumitrescu等^[16]将含鼠伤寒沙门氏杆菌LPS(10 μg/μL)的1 μL盐水注射于第一、第二磨牙间的牙间乳头处。注射后第3天时无明显的骨丧失和破骨细胞数目的改变,而在第7和第10天时均出现骨丧失,破骨细胞数目和活性的增加,胶原纤维破坏,Giems染色显示上皮及上皮结缔组织内炎症细胞浸润,并出现牙间乳头火山口状破坏等类似人类牙周炎症的组织学表现。此种方法利用生物学刺激造模,真实有效地模拟了人类牙周炎发病过程,现已广泛应用于口腔微生物学的研究中。

3.3 高糖黏性食料法

通过改变易感动物的饮食习惯,制定特殊的牙周炎食谱,以达到菌斑堆积的目的,亦是一种有效的建模方法。其食谱^[17]如下:100 g食物中包括蔗糖56 g、全脂奶粉28 g、全麦粉6 g、酵母粉4 g、肝粉1 g、食盐2 g、新鲜蔬菜4 g。高糖黏性软食易黏附于牙面,不利于牙齿自洁,从而促进菌斑的附着、堆积和滋生。有文献报道^[18]此种方法作用8周后可诱导出明显的牙周炎临床表现,第一磨牙区有牙周袋形成,牙面、袋内及根面有大量

菌斑堆积,组织病理学观察显示沟内上皮出现糜烂,可见大量中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润,牙周隙隙明显增宽,牙周膜纤维排列紊乱或断裂,可见牙槽骨吸收。此种方法操作简单但单独作用效果一般,大多做为其他局部刺激因素的辅助手段用于牙周炎动物模型的建立。

3.4 多种方法联合应用

单独使用某种方法,存在着建立牙周炎模型可控性差的特点,而多个诱导因素的联合应用,可更加快速有效地诱导牙周炎形成。Oates等^[19]用接种有牙龈卟啉单胞菌(Pg)的丝线结扎于猕猴双侧下颌前磨牙和第一、第二磨牙的牙龈沟内,同时饲以软食,6周后发现牙龈指数及龈沟液水平显著升高,X线检查提示牙槽骨丧失明显,骨密度显著降低。此外,Nogueira等^[20]联合丝线结扎法及牙合创伤法建立牙周炎动物模型。该学者首先磨去雄性Wistar大鼠第二、第三磨牙的牙尖,但不致引起牙髓损伤和暴露,以造成双侧第一磨牙牙合力过大,然后随机选取一侧下颌第一磨牙颈部结扎棉线,对侧作为对照,30天后各项指标即显示牙周炎模型制备成功。李生娇等^[21]等采用丝线结扎法加注射激素法也成功建立了牙周炎模型。SD大鼠给予注射醋酸可的松混悬液,共28天,在第15天时,采用丝线结扎右侧下颌第一磨牙牙颈部。第4、6、8、10周时通过检查发现结扎组及激素+结扎组均表现出明显的牙周炎体征,且激素+结扎组较单纯结扎组更为严重,但是单纯激素组并未产生明显牙周炎症状,表明仅有糖皮质激素失调并不能引起牙周炎的发生,但却能加重牙周炎的严重程度。马宁^[22]则采用丝线结扎加细胞因子注射的方法,也取得了较好的效果,其结果显示IL-1β与TNF-α联合作用于兔牙周组织中,一方面对牙龈组织引起炎症的程度比单纯应用IL-1β、TNF-α更为严重,另一方面在炎症发生的时间上比单纯应用IL-1β、TNF-α更为提前,但对牙槽骨的破坏吸收方面基本与单纯应用IL-1β、TNF-α相同。Gaspersic等^[23]发现联合结扎丝线和皮下注射TNF-α法比单独结扎丝线能引起更为严重的牙周炎反应和牙周破坏。Ekuni^[24]研究了LPS与蛋白酶联合作用于Wistar大鼠形成牙周炎的效果,造模8周后应用组织学及免疫组织化学来评定组织学的改变。结果提示:LPS组可见结合上皮根方迁移,结缔组织内B细胞数目增多,牙槽骨吸收。联合组结合上皮根方迁移及牙槽骨吸收比LPS组明显,B细胞数目更多。说明LPS与蛋白酶联合作用于牙周亦能引起较为严重的牙周组织破坏,联合组引起的破坏与已确立的人类牙周炎情况极为相似。

4 小结

牙周炎动物模型建立的方法多种多样,且日趋成熟。根据不同的研究目的制定相应的造模方案,以更好的模拟牙周炎的发生发展过程是造模的关键,还有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] 李德懿. 牙周病微生物学[M]. 天津科技翻译出版公司, 1994, 93
Li De-yi. Microbiology of periodontal diseases[M]. Tianjin Science and Technology Translation Publishing Corporation, 1994, 93(In Chinese)
- [2] 章魁华, 于世凤. 实验口腔病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 36-37
Zhang Kui-hua, Yu Shi-feng. Experiment Oral Pathology [M]. Beijing:

- People's Medical Publishing House, 2002, 36-37(In Chinese)
- [3] S. Wang, Y. Liu, D. Fang, S. Shi. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research [J]. Oral Diseases, 2007,13(6):530-537
- [4] H. S. Oz and J. L. Ebersole. A novel murine model for chronic inflammatory alveolar bone loss[J]. Journal of Periodontal Research, 2010, 45(1): 94-99
- [5] H.S. Oz, and D.A.Puleo. Animal models for periodontal disease [J]. J Biomed Biotechnol, 2011,754857(Online Impress)
- [6] X. Struillou, H. Boutigny, A. Soueidan, et al. Experimental animal models in periodontology: a review [J]. The Open Dentistry Journal, 2010,29: 37-47
- [7] Holzhausen M, Rossa Junior C, Marcantonio, et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats[J]. J Periodontol, 2002, 73 (9): 1030-1036
- [8] Marikova Z, Kindlova M, Mrklas L, et al. Effect of changes in oral conditions on periodontal health in rats. III. Effect of sialoadenectomy on ligature-induced periodontal changes [J]. Cesk Stomatol, 1979,79 (2): 92-96
- [9] Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats[J]. J Dent Res, 2004,83(4):343-348
- [10] Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, et al. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat[J]. J Periodontol, 2003, 74(4): 494-500.
- [11] Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats [J]. J Periodontol, 2000,71(6):1009-1014
- [12] Kuhr A, Popa Wagner A, Schmoll H, et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats[J]. J Periodontal Res, 2004, 39(2): 101-106
- [13] Galvao MP, Chappier A, Rosing CK, et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats[J]. Pesqui Odontol Bras, 2003,17(1):56-62
- [14] Goncalves PF, Nogueira Filho GdA R, Sallum EA, et al. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis-a study in rats[J]. Pesqui Odontol Bras, 2003,17(1):46-50
- [15] Schreiner HC, Sinatra K, Kaplan JB, et al. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (12): 7295-7300
- [16] 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
- [17] 吴世莲, 刘丽. 牙周炎动物模型的研究概况[J]. 口腔医学, 2006,26(5): 385-387
- Wu Shi-lian, Liu Li. The research of periodontitis animal model [J]. Stomatology, 2006,26(5):385-387(In Chinese)
- [18] 孔耀, 刘鲁川, 周霞, 等. 模拟高原缺氧对慢性牙周炎大鼠牙龈组织中基质金属蛋白酶-2活性的影响[J]. 解放军医学杂志, 2010,35(3): 330-332
- Kong Yao, Liu Lu-chuan, Zhou Xia, et al. Effect of simulated altitude hypoxia on the activity of matrix metalloproteinase-2 in gingival tissue of chronic periodontitis rat model [J]. Med J Chin PLA, 2010,35 (3):330-332(In Chinese)
- [19] Oates TW, Graves DT, Cochran DL. Clinical radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(2): 137-143
- [20] Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, et al. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats[J]. J Periodontol, 2004, 75(3): 348-352
- [21] 李生娇, 曹志中, 周中华. 糖皮质激素对牙周炎发病作用的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2002,18(4):253-255.
- Li Sheng-jiao, Cao Zhi-zhong, Zhou Zhong-hua. Experimental study for the role of glucocorticoid on periodontitis[J]. J Clinical Stomatology, 2002,18(4):253-255(In Chinese)
- [22] 马宁, 张颖丽, 张莉, 等. 牙周炎动物模型的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 2001,27(6): 611-613
- Ma Ning, Zhang Ying-li, Zhang Li, et al. A study in periodontitis animal model [J]. J Norman Bethune University of Medical Science, 2001, 27(6):611-613(In Chinese)
- [23] Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, et al. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats[J]. J Periodontal Res, 2003, 38(2): 198-203
- [24] Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, et al. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingival [J]. J Periodontal Res, 2003, 38(6):591-593