

牙槽骨缺损与弹性结扎快速构建慢性牙周炎 Beagle 犬模型的研究^①

董妮¹, 宋锦璘¹, 冯格¹, 刘珉懿¹,
杜永洪², 赵纯亮², 王智彪², 邓锋¹

1. 重庆医科大学 附属口腔医院, 重庆 400015; 2. 重庆医科大学 医学超声工程研究所, 重庆 400016

摘要: 探索快速构建牙槽骨缺损联合弹性结扎致慢性牙周炎 Beagle 犬模型的方法, 为超声治疗慢性牙周炎提供研究平台。6 只 Beagle 犬选择上下颌双侧第三前磨牙颊侧翻瓣, 制备 6 mm×6 mm×3 mm 的牙槽骨缺损, 左右侧采用自身对照。对照组直接缝合牙龈, 实验组缝合牙龈后一周置入正畸弹性牵引橡皮圈, 术后第 2, 4, 6, 8, 10 周摄 X 片, 行形态学和组织学观察。临床检查以牙龈发红、水肿、探诊出血、牙周袋形成为主要症状。第 10 周左右, 牙龈炎逐渐向牙周炎发展, 观察到牙周袋形成、牙槽骨吸收、以及显著的病理性成骨。牙槽骨缺损联合弹性结扎可快速构建牙周炎模型, 缩短慢性牙周炎 Beagle 犬模型构建周期, 较好地模拟临床牙周炎的病理病变过程, 值得推广应用。

关键词: 慢性牙周炎; Beagle 犬; 快速

中图分类号: Q95, R781.4

文献标识码: A

牙周炎是侵犯牙龈和牙周组织的慢性炎症, 是一种破坏性疾病, 其主要特征为牙周袋形成、牙槽骨吸收、牙齿逐渐松动, 是导致成年人牙齿丧失的主要原因。

目前, 牙周炎治疗以控制牙周组织吸收为主要目的, 基础、药物及手术等综合性治疗为常用手段, 但其病因及发病机理至今尚未完全明确, 使得牙周炎彻底治疗相对困难^[1]。

慢性牙周炎实验动物模型是探索牙周炎治疗新技术的必要条件之一。在以往研究中, 诸如 Brunsvold 等^[2-4]采用不同方法(如高糖饮食、结扎、手术刺激、口腔结种特异菌等)构建了牙周炎动物模型, 发现单一方法构建模型周期长、与临床差异大、操作不便甚至实验动物死亡等不足, 影响疗效观察和评价^[4,5], 尚缺乏较理想的牙周炎动物模型。

因此, 快速建立一种简便、经济、临床病征相近的实验动物模型仍是重要的研究问题之一。本研究旨在探索牙槽骨缺损联合弹性结扎快速构建慢性牙周炎 Beagle 犬模型的制备方法, 为进一步研究超声治疗牙周炎提供研究平台。

1 材料和方法

1.1 实验对象

6 只健康 Beagle 犬(重庆医科大学动物实验中心提供), 雄性, 年龄 1~1.5 岁, 体质量 10~20 kg。恒

① 收稿日期: 2007-09-04

基金资助: 超声医疗国家工程研究中心资助、国家教育部创新团队发展计划资助项目(教技函[2005]33号)。

作者简介: 董妮(1981-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事口腔医学研究。

通讯作者: 宋锦璘, 副教授。王智彪, 教授。

齿出齐, 牙体、牙列完整, 无龋坏, 无明显磨耗, 牙周情况良好, 无牙槽骨缺损, 牙龈乳头完整无红肿出血。选择上下颌第三前磨牙区作为实验对象, 采用自身对照原则, 一侧为实验组, 另一侧为对照组。适应性饲养 1 周, 做一般状态观察, 术前准备。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

速眠新 II 注射液(长春军医大学兽医研究所试制)、生理盐水、酒精、过氧化氢、碘酊、青霉素钠盐、2%利多卡因、盐酸肾上腺素注射液(1:300000)等。

1.2.2 器械

喷水涡轮机钻(日本 NSK 公司)、骨凿、骨膜分离器、金刚砂车针、牙周刻度探针、龈上龈下刮治器、正畸用弹性牵引橡皮圈(美国 3M 公司, 4.6 mm)、犬头颅定位仪(自制)、数字化 X 线片成像系统(芬兰 PLANMECA 公司, 放大率 11.1%)等。

1.3 方法

1.3.1 模型构建

6 只 Beagle 犬建模前行临床牙周检查: 牙周临床附着水平(Periodontal clinical attachment level, CAL)、牙周袋深度(Pocket depth, PD)、出血指数(Bleeding index, BI)及 X 线片未见破坏性的牙周疾患。

麻醉固定: 0.1 mL/kg 速眠新 II 后肢臀部肌注, 四肢固定于犬固定床, 绷带张口固定, 消毒铺巾。含肾上腺素 2%利多卡因浸润注射术区口腔前庭沟底, 减少术区出血和保证麻醉深度。

翻瓣去骨: 第三前磨牙区颊龈侧做梯形切口, 翻黏骨膜瓣后, 涡轮钻和骨凿在局部喷水下间歇磨除釉牙骨质界下 6 mm, 近远中向 6 mm, 深 3 mm 的牙槽骨, 使颊侧根分叉完全暴露, 刮治器刮除根面牙周膜; 术中采用金刚砂细车针在牙槽骨缺损底部根面制备切迹作为组织学测量参照点。

缝合: 0.9%生理盐水和 3%过氧化氢冲洗后对位缝合, 缝线待自行脱落。术后给予青霉素钠盐 80 万 U/(kg·d)⁻¹连续肌注 3 天, 辅以软食以增加菌斑的堆积, 减少牙周组织的创伤及牙龈边缘的退缩。

正畸弹性牵引橡皮圈接扎: 去骨术后一周, 待软组织基本愈合, 全麻下将弹性牵引橡皮圈环绕实验组牙颈部龈缘, 用探针和镊子将其压入龈沟底部。每周检查 1 次, 橡皮圈脱失者重结扎。

1.3.2 观察指标

大体观察: 实验期间 Beagle 犬活动状况、毛发、体质量、食欲及粪便情况。

临床指标检查: BI、PD、CAL、牙结石度和 Glickman 根分叉分度标准。

X 线摄片: 在建模术前及后 4 周、6 周、8 周、10 周时间点拍摄 X 线牙片, 观察实验牙牙槽骨吸收情况。

组织学观察: 第 10 周获取实验牙周围组织标本放入 10%福尔马林中固定 48 h 后, 转入 15%EDTA 中, 4℃脱钙 7 天, 梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋, 沿牙长轴近远向纵切(切片厚度 5 μm)。常规 HE 染色, 光镜下观察。

2 结果

2.1 一般状况

Beagle 犬初次手术后进食量减少, 3 天后逐渐恢复正常; 毛发较光亮、活动尚正常; 2 月后体质量减轻; 但未见明显实验动物术后不适。

2.2 临床指标及 X 线检查

临床检查以牙龈发红、水肿、探诊出血、牙周袋形成为主要症状。随着时间进展, 炎症逐渐由牙龈炎向牙周炎发展, 牙周袋逐步形成、牙槽骨吸收以及显著的病理性成骨(图 1—4)。



图 1 建模前牙片



图 2 建模前实验牙牙周情况

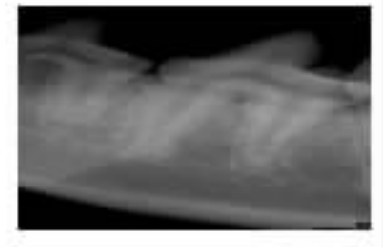


图 3 牙槽骨缺损后牙片



图 4 牙槽骨缺损后牙周情况

术后 1 周: 实验组牙颈部软垢堆积明显, 牙龈发红, 探诊出血, 牙无明显松动.

术后 4 周: 实验组牙龈肿胀状态有所减轻, 较之周围正常牙龈组织, 牙龈组织颜色较暗, 可见少量脓液, 牙齿无松动, 颈缘牙结石堆积.

术后 6 周: 实验组牙龈发红, 触诊易出血, 个别牙龈有退缩, X 线示未见明显骨吸收或牙槽骨高度的改变.

术后 8 周: 实验组牙龈暗红, 有自发性出血, 牙周临床附着有丧失.

术后 10 周: 实验组局部牙龈红肿, 牙周袋深 6 mm, 易出血, X 线示牙槽骨明显吸收, 手术探查证实炎症性骨吸收存在.

2.3 组织学观察

2.3.1 对照组

光镜观察显示牙龈上皮结构完整, 上皮结缔组织内见少量的炎细胞浸润, 结合上皮附着于釉牙骨质界附近的牙表面, 牙周膜纤维整齐排列(图 5).

2.3.2 实验组

牙龈糜烂坏死, 牙周膜纤维排列紊乱. 牙槽嵴顶及深部牙槽骨吸收, 有深牙周袋形成, 牙槽骨中可见破骨细胞和骨吸收陷窝(图 6).



图 5 对照组牙龈组织切片(HEX100)

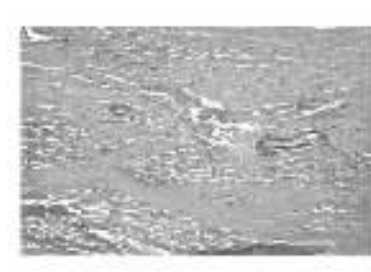


图 6 实验组牙槽骨切片(HEX100)

3 讨论

Beagle 犬系较理想的用于建立实验性牙周炎模型的动物之一, 所构建牙周炎模型与人牙周炎近似程度高^[6]. 本研究发现牙槽骨缺损联合弹性结扎方法可以快速构建慢性牙周炎 Beagle 犬模型, 其可能的形成机制及干扰因素为:

1) 弹性结扎对慢性牙周炎的快速诱导作用

口腔菌群失调是导致牙周炎的主要因素,局部刺激是导致菌群失调的重要条件^[1]。

局部弹性橡皮圈结扎可造成菌斑和牙石堆积,结扎部位有慢性炎症细胞浸润。与人类牙周炎相比,该模型局部炎症细胞浸润程度较轻,牙槽嵴顶轻度吸收,即细菌刺激因素之外尚存在弹性结扎的机械损伤作用。

本研究采用弹力橡皮圈代替丝线进行牙颈部结扎,可充分附着食物残渣和细菌,形成牙周局部病变环境;此外,弹性结扎可沿牙根自行下滑,加深牙周袋或附着水平丧失,快速形成类似人类牙周炎的疾病模型。

2) 牙槽骨缺损过渡为慢性牙周炎的作用机制

1994年, Caton^[7]手术去除牙槽骨、牙骨质和牙周膜造成急性缺损后构建牙周炎模型,但术后实验动物牙周有自愈倾向(非人灵长类动物有50%~70%的自发牙周再生)。仅通过菌斑、牙石等各种因素诱导的慢性炎症,构建周期过长,影响因素较多,可影响牙周组织的愈合,不利于同一状态下牙周组织的评价。

2004年, Kim^[8]发现不同类型的牙槽骨缺损所导致的牙周袋类型不一,水平型骨上缺损和I壁骨袋模型因丧失的骨量较多,牙周附着再获得相对困难。而骨内袋模型中, III壁骨袋的牙周附着再获得可能性大于I壁骨袋^[6]。

2006年, 刘珉懿^[9]等利用糖皮质激素注射加牙颈部结扎构建 Beagle 犬双尖牙根分叉病变牙周炎模型,其建模周期长达半年之久,且全身应用激素对研究超声治疗牙周炎可能会有一定影响。

基于上述考虑,本研究预先造成 III 壁骨内袋骨缺损后,再置入弹性橡皮圈诱导牙周炎,同时阻止牙龈上皮与缺损部位的牙根、牙槽骨结合,形成牙周袋。在弹性橡皮圈和菌斑的联合刺激下,术后6周起,牙龈充血、水肿、牙龈退缩,出现牙槽骨吸收等典型的慢性牙周炎症表现,在10周内过渡为典型的慢性牙周炎症,且无大量的自发组织再生现象。

3) 快速构建慢性牙周炎模型的干扰因素

Beagle 犬牙周炎模型构建中,值得关注实验操作中麻醉的不良反应,麻醉时间较长利于操作,但不利于术后的恢复,可能会对观察指标和结果存在不利的影 响。因此,研究中选用速眠新 II,其显效时间短利于操作,且麻醉深度适中,同时也需要强化实验操作技能以缩短操作时间。

Beagle 犬上下颌第三前磨牙的牙冠形态相似,但其牙根长短仍有一定差异,因此 6 mm×6 mm×3 mm 大小的牙槽骨缺损在不同个体和区位上,各牙残留牙周膜量有一定的差异,在评价牙周炎模型时候值得考虑。

综上所述,牙槽骨缺损辅以弹性结扎可快速构建 Beagle 犬牙周炎动物模型,其牙周炎症的发生和发展与人类牙周炎接近,较好的模拟了人类牙周炎的病理病变过程,缩短了模型构建周期,为深入研究牙周炎超声治疗提供良好的平台。

参考文献:

- [1] 曹采方. 牙周病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 30 - 31.
- [2] Brunsvold A M, Chaves E S, Worrmaan K S, et al. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys [J]. J Periodont, 1992, 63(10): 825 - 830.
- [3] FISCHER R, KLINGE B. Clinical and histological evaluation of ligature induced periodontitis in the domestic ferret [J]. J clin Periodont, 1994, 12(4): 230 - 239.
- [4] BIANCU S, ERIESSON I, LINDHE J. Periodontal ligament tissue reaction to trauma and gingival inflammation: an experimental study in the beagle dog [J]. J Clin Periodont, 1995, 22(10): 772 - 779.
- [5] Caroline A, Genco R J, Thomas Van Dyke, et al. Animal models for porphyromonas gingivalis mediated periodontal disease [J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(11): 1444 - 1445.
- [6] Weinberg M A, Bral M. Laboratory animal models in periodontology [J]. J Clin Periodontol, 1999, 26(6): 335 - 340.
- [7] Caton J, Mota L, Gandini L, et al. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures [J]. J periodontol, 1994, 65(12): 1143 - 1150.
- [8] Kim C S, Choi S H, Chai J K, et al. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs: Influence of the

number of bone walls on healing response [J]. *J Periodontol*, 2004, 75(2): 229 – 235.

- [9] 刘珉懿, 宋锦璘, 冯 格, 等. Beagle 犬双尖牙根分叉病变牙周炎模型的初步建立 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1296 – 1297.

The Study of Rapidly Construction of Chronic Periodontitis in Beagle Dogs Caused by Alveolar Bone Defect with Ligation

DONG Ni¹, SONG Jin-lin¹, FENG Ge¹, LIU Min-yi¹,
DU Yong-hong², ZHAO Chun-liang², WANG Zhi-biao², DENG Feng¹

1. *College of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China;*

2. *Institute of Ultrasound Engineering in Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*

Abstract: The authors study the fast way to establish the Beagle dog model of chronic periodontitis caused by alveolar bone defect with ligation, to provide the research platform for the further approach of the ultrasonic therapy of periodontitis. All the third premolars of six Beagle dogs were removed alveolar bone ($6 \times 6 \times 3 \text{ mm}^3$) by surgical way. Left and right sides were divided into the experimental group and the control group. On one side, flaps of the jaws were sutured immediately. The other side were sutured and the orthodontic elastic ligation were placed after one week. The Beagle dogs were observed through periodontal clinical index and X-ray examinations of experimental tooth in 2nd, 4th, 6th, 8th and 10th weeks. Morphology and Histological studies were performed after 10th weeks. Clinical examination found that gingival redness, edema, bleeding on probing, pocket formation were the main symptoms. As time progressed, the symptoms gradually changed from gingivitis to periodontitis. The periodontal pocket formation and alveolar bone absorption appeared. Those results indicated that rapidly construction of periodontitis model can be produced by combination of alveolar bone defect with ligation, which simulated the clinical pathological periodontal disease process fastly. It could provide a better way for rapid construction of chronic periodontitis in Beagle dog.

Key words: chronic periodontitis; beagle dogs; rapidly

责任编辑 胡 杨