

大鼠后牙牙槽骨吸收模型的建立及破骨细胞的鉴定

郭子杰 戴永雨 栾文民 于世凤

摘要：目的 建立大鼠后牙牙槽骨吸收模型并对破骨细胞(OCs)进行鉴定。方法 用 3-0 丝线结扎大鼠上颌第二磨牙牙颈部并喂以高糖软食,行 H-E 切片常规组织学观察结扎后牙周组织的变化;应用抗 CTR 抗体通过免疫组化的方法鉴定 OCs。结果 大鼠后牙结扎后第 3 天,结扎部位上皮糜烂,结缔组织见大量炎症细胞浸润,牙槽骨表面出现蚕食状吸收陷窝,第 7 天以后,结扎部位牙槽骨高度降低。在牙槽骨表面形成的骨吸收陷窝内及附近组织,可见 CTR 阳性的多核和单核细胞。结论 丝线结扎和高糖软食的局部刺激成功地诱导了大鼠牙槽骨破骨细胞性骨吸收。应用抗 CTR 抗体通过免疫组化的方法鉴定 OCs 可用于探讨牙槽骨吸收机制的研究。

关键词：牙槽骨吸收;破骨细胞;降钙素受体;大鼠

Alveolar bone resorption in rats with silk-ligature and 10% sucrose-softed diet and the identification of OCs by calcitonin receptor antibodies GUO Zijie, DAI Yongyu, LUAN Wenmin, et al. Department of Stomatology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract : Objective To build a mode of Alveolar bone resorption in rats and identify OCs by calcitonin receptor antibodies. **Methods** Black 3-0 gauge silk ligatures were placed around the cervix of the second maxillary molars of Sprage-Dawley rats weighing 280-300g, which were fed with 10% sucrose-softed diet. Osteoclasts and its precursor cells at periodontal tissues was identified with calcitonin receptor(CTR) immunohistochemistry. **Results**

H-E staining of sections reveals inflammatory cell invasion and capillary dilatation in the connective tissue of the area from immediately beneath the epithelium onto which the ligature was placed, to near the alveolar bone crest on Day 3. Undermining bone resorption occurred to a large extent on the surface of alveolar bone where numerous resorption lacunae containing multinucleated cells were observed on Day 3 and Day 7. The heights of alveolar bone decreased significantly on Day 14. The multinucleated cells located in and around the alveolar bone resorption lacunae were CTR-positive. In addition, there were some mononuclear CTR-positive cells nearby, which might be osteoclast precursors. **Conclusions** Ligature treatment would cause alveolar bone resorption in rats fed with 10% sucrose-softed diet. The expression of CTR of osteoclasts and its precursors in periodontal tissue confirmed the involvement of osteoclasts in alveolar bone resorption.

Key words : Alveolar bone resorption ; Osteoclasts ; Calcitonin receptor ; Rats

牙周炎是口腔领域的常见病、多发病,主要病理变化为牙龈炎症、牙槽骨吸收和牙周袋形成等^[1]。牙周炎发生发展过程中造成的牙槽骨吸收是牙齿松动、脱落的直接原因。因此,研究牙槽骨吸收的机制是防治牙周炎的重要课题。牙槽骨吸收机理和防治的研究不可能首先在人体身上进行,因此,应建立合

适的动物模型,模拟牙槽骨吸收的过程。

根据局部因素是导致牙槽骨吸收的主要原因,建立牙槽骨骨吸收动物模型主要分为两种方法:即局部因素诱导和局部因素诱导加全身因素促进^[2]。局部因素诱导包括牙颈部结扎、局部涂菌和高糖食料喂养等。我们选择大鼠为实验对象,采用丝线结扎上颌第二磨牙并辅以高糖软食喂养,建立大鼠牙槽骨吸收模型,通过常规组织切片对结扎后不同时间牙龈组织的炎性变化和牙槽骨吸收情况进行了观察,并应用抗降钙素受体(Calcitonin receptor,CTR)抗

作者单位:100730 北京,卫生部北京医院口腔科(郭子杰、戴永雨、栾文民),北京大学口腔医学院(于世凤)

通讯作者:郭子杰,Email: zjieguo@hotmail.com

体通过免疫组化的方法对牙周组织中的破骨细胞 (Osteoclasts ,OCs) 进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 S.D 大鼠 16 只 ,重 280 g 左右 ,购自中国医学科学院实验动物繁殖场。购买后 ,静养 1 w ,以使其适应新环境。

1.2 牙周局部丝线结扎

用 2% 硫喷妥钠腹腔注射麻醉大鼠 (45 ~ 50 mg/kg 体重) ,用小圆针带 3-0 黑色丝线 ,穿过上颌第 1 与第 2 磨牙、第 2 与第 3 磨牙牙间隙 ,围绕上颌第二磨牙颈部结扎。每只大鼠结扎一侧 ,对侧作为对照。

结扎手术后 ,用 10% 蔗糖溶液浸软的饲料喂养大鼠。每日检查结扎线 ,如有脱落 ,重新结扎。

1.3 标本的制备和 HE 染色

手术后第 3、7、14 和 21 天 ,分别处死大鼠 4 只 ,切取两侧带 3 个磨牙的上颌骨块 ,浸入新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液中固定 12 h。为加快脱钙速度 ,用涡轮牙钻将 3 个磨牙牙冠的大部磨除 ,入 Formical-4 脱钙液 (Decal Chemical Corporation) 脱钙 24 h ,检查组织变软后 ,经 30% ~ 100% 梯度酒精脱水 ,二甲苯透明 ,石蜡包埋。

经矢状面切 5 μ m 左右厚连续切片 ,常规 HE 染色 ,光镜下观察。

1.4 抗 CTR 抗体免疫组化染色

将组织切片裱于经 APES 处理的玻片上 ,应用北京中山生物技术有限公司 HistostainTM-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒进行抗 CTR 抗体 (山羊抗鼠 CTR 多克隆抗体 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 免疫组化染色。

2 结果

2.1 常规组织学观察

(1) 炎症细胞浸润 :切片 H-E 染色显示 ,在结扎术后第 3 天和第 7 天 ,结扎处上皮不完整 ,糜烂 ,下方邻近牙槽嵴处的结缔组织可见大量炎症细胞浸润和毛细血管扩张。浸润的炎症细胞主要是多型核白细胞 ,有少量的单核细胞 ,结缔组织血管扩张 ,纤维排列紊乱 (图 1) ;到第 14 天 ,结缔组织炎性细胞浸润减少 ,纤维成分增多 (图 2) 。到第 21 天 ,炎症细胞浸润明显减少 ,纤维排列更整齐。不结扎一侧 ,牙龈上皮和沟内上皮规整 ,无明显炎症 ,结缔组织中的纤维排列整齐。



图 1 在结扎术后第 3 天 ,结扎处上皮不完整 ,下方邻近牙槽嵴处的结缔组织可见大量炎症细胞浸润 ,血管扩张。牙槽骨表面出现骨吸收陷窝及多核巨细胞 (H-E 染色 , $\times 100$)



图 2 结扎第 14 天 ,牙周结缔组织炎症细胞浸润减少 ,牙槽嵴顶低平 (H-E 染色 , $\times 100$)

(2) 牙槽骨吸收 :第 3 天时 ,在丝线结扎部位下方 ,在牙槽嵴顶及牙槽骨的近中、远中面可见骨吸收陷窝 ,呈蚕食状。在骨吸收陷窝内及周围有大量体积较大的单核和多核巨细胞 (图 1) 。第 7 天时 ,仍可见骨吸收陷窝 ;在第 14 和第 21 天时 ,牙槽骨表面单核和多核巨细胞的数量减少 ,但牙槽嵴顶变得低平 ,牙槽嵴高度降低 ,有些区域可见不规则的骨沉积线 ,说明有新骨形成 (图 2) 。

2.2 抗 CTR 抗体免疫组化染色

抗 CTR 抗体免疫组化染色显示 ,在结扎部位处的牙槽骨表面骨吸收陷窝内的单核和多核细胞 CTR 阳性 (图 3) ,有的切片 ,牙槽骨表面吸收陷窝内虽未见有细胞影像 ,但陷窝表面可见 CTR 阳性膜样结构。

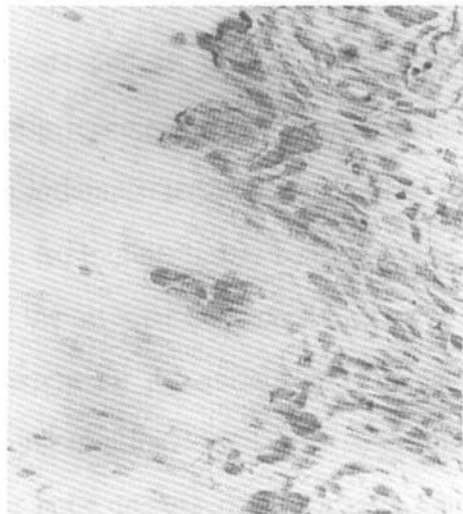


图3 结扎第3天,牙槽骨吸收陷窝处的 CTR 阳性细胞(免疫组化染色,SP法,DAB显色,×400)

3 讨论

牙周炎是包括菌斑在内的局部刺激因素的直接细胞毒作用、蛋白分解作用,以及宿主对持续存在的菌斑微生物的免疫应答所引起间接损伤的结果。建立动物实验性牙周炎模型有助于了解牙周炎的初起和进展,便于探讨包括牙槽骨吸收在内的组织破坏的机制^[3]。

菌斑微生物是引发牙周病的始动因子,是造成牙周破坏的必需因素,其他局部因素如牙石、创伤、食物嵌塞等对疾病的发生发展有促进作用。牙周局部结扎是建立动物实验性牙周炎模型的常用方法。我们用 3-0 丝线结扎大鼠上颌第二磨牙,并加以高糖软料喂养,在第3天时,结扎处上皮糜烂,下方结缔组织可见大量炎症细胞浸润,其中以中性核白细胞为主。在牙槽嵴顶和牙槽骨近、远中面可见骨吸收陷窝和多核巨细胞。结扎 14 d 以后,炎症反应虽减轻,并出现纤维性修复和不规则成骨,但牙槽骨高度仍有降低。通过组织学观察可以认为,采用丝线结扎同时喂以高糖软食,可诱导大鼠牙周组织出现明显的炎症反应,发生严重的牙槽骨吸收。

追究大鼠牙周组织发生破坏的机理在于,用丝线结扎时,对牙龈有机械创伤,同时丝线的存在对牙龈不仅是一种异物刺激,还可增加菌斑的积聚。喂高糖软食,有利于食物在局部沉积,促进细菌繁殖,使其在局部的聚集加重。

由细菌感染或其产物等诱导产生的趋化因子对白细胞、单核细胞和淋巴细胞等在局部聚集有重要

作用^[4]。中性多形核白细胞组成是宿主抗感染的主要因素,细胞内的蛋白酶可以消化吞噬的细菌,但是在牙周炎时,这些酶能够释放到细胞外,导致组织的消化破坏,还能使上皮细胞分离,导致牙周袋内衬上皮溃疡。中性多形核白细胞的渗出和移动能通过机械破坏或通过释放溶酶体酶和胶原酶损伤组织,抑制成纤维细胞的分化和胶原的更新并能增强骨吸收。牙周炎症组织中的巨噬细胞也可释放溶酶体酶和其他因子如胶原酶和前列腺素等,抑制成纤维细胞的生长、分化及胶原的更新,使结缔组织降解,并可使破骨细胞活化,促进骨吸收。

本研究显示,丝线结扎并辅以高糖软食,在第3天时牙槽骨表面出现大量的骨吸收陷窝,其内及周围可见多核巨细胞。到第2周时,牙槽骨高度降低。国内外的研究都认为牙槽骨吸收是与 OC 相伴随的,牙槽骨的吸收破坏是局部破骨细胞数量增多和活性增强的结果。但对于破骨细胞募集于局部并活化的机制并不明确。

破骨细胞参与骨吸收,它的数目和形成速度是决定骨量多少的关键,牙周炎时的骨破坏是由于破骨细胞数目增多和活性增强所致。尽管破骨细胞有典型的形态学特征,但它们并不总是易于鉴定^[5]。

CTR 属于 7 次跨膜 G-蛋白偶联受体亚家族 II 成员,在髓样单核细胞系中,破骨细胞是唯一表达 CTR 的细胞。长期骨髓培养时,CTR 的表达与骨吸收有较好的相关性^[6],现一般认为 CTR 的表达是体内、外破骨细胞表型中一个可靠的标记物。降钙素受体(CTR)的检测可以明确地鉴定破骨细胞并将其与多核巨噬细胞区分^[7]。

破骨细胞常位于骨表面、邻近或在 Howship's 陷窝中。我们的观察也表明牙槽骨吸收陷窝内的多核巨细胞 CTR 阳性,这些细胞在 H-E 染色的组织切片上比较容易判断是破骨细胞。但我们通过 CTR 免疫组化染色发现,骨吸收陷窝内的部分单核细胞也表达 CTR,在邻近骨表面的结缔组织中,特别是骨髓腔中,存在 CTR 阳性单核和多核细胞,这部分细胞在 H-E 切片不能肯定是破骨细胞,它们与巨噬细胞很难区别,因为炎症性牙龈组织中存在激活的单核和多核巨噬细胞。通过免疫组化染色可以认为这些 CTR 阳性的多核细胞就是破骨细胞,单核的 CTR 阳性细胞可能是破骨细胞前体细胞。

我们还观察到,有的骨吸收陷窝内并没有细胞影像,但在骨表面可见 CTR 阳性的膜样结构。这可能是切片时未能切到细胞轮廓所致。所以,如仅以

细胞的存在作为指标 ,可能低估骨吸收的发生。

用免疫组化方法检测 CTR 表达 ,即可以区分破骨细胞和巨噬细胞 ,也可以识别在形态学上很难判断的破骨细胞 ,有助于对骨吸收作出准确、客观的评估。单核破骨细胞前体细胞的鉴定对了解破骨细胞的来源及其分化、融合、成熟的机制有重要的意义。

【 参 考 文 献 】

[1] 于世凤 ,主编 . 口腔组织病理学 . 第 5 版 . 北京 :人民卫生出版社 2003 :177-186 .
[2] 杨新雪 ,仝月华 ,张举之 ,等 . 牙周炎的动物模型研究 . 实用口腔医学杂志 ,1990 6 6-8 .
[3] Shibutani T ,Murahashi Y ,Tsukada E ,et al . Experimentally induced periodontitis in beagle dogs causes rapid increases in osteoclastic

resorption of alveolar bone . J Periodontol ,1997 68 385-391 .
[4] 刘荣坤 ,曹采方 ,孟焕新 ,等 . TNF- α 及 IL-1 β 多型核白细胞在牙周炎症组织中浸润的关系 . 中华口腔医学杂志 ,2000 35 :327-329 .
[5] Baroukh B ,Saffar JL . Identification of osteoclasts and their mononuclear precursors . A comparative histological and histochemical study in hamster periodontitis . J Periodont Res ,1991 26 :161-166 .
[6] Lee SK ,Goldring SR ,Lorenzo JA . Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone :a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin . Endocrinology , 1995 ,136 4572-4581 .
[7] Quinn JMW ,Morris M ,Lam HC ,et al . Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclast . Bone ,1999 25 :1-8 .

(收稿日期 :2006-10-08)