

# 建立小型猪II度根分叉缺损模型的可行性\*★

陈 珊, 杨军英, 张盛炎, 冯 磊

## Feasibility to establish a mini-pig model of class II furcation defect

Chen Shan, Yang Jun-ying, Zhang Sheng-yan, Feng Lei

### Abstract

**BACKGROUND:** The premise of an effective evaluation of periodontal tissue regeneration is to successfully establish alveolar bone defect model. Most of previous studies use dogs as experimental animals, but the operation is more difficult.

**OBJECTIVE:** To investigate the possibility of establishing an animal model of class II furcation defect in mini-pigs.

**METHODS:** Mini-pig models of class II furcation defect were prepared. The model group did not receive any agents while the control group was weekly injected with 2.2 mg simvastatin/methylcellulose gel.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Eight weeks later, gross and pathological observation showed that it was empty in the defects of the model group and new bone was found in the control group. Mature fibrous tissue and proliferative vessels as well as a large number of osteoblasts and osteocytes were observed in the control group, while little new bone, proliferative vessels and a small number of osteoblasts were observed in the model group. These results showed that it is feasible to establish class II furcation defect in mini-pigs.

Chen S, Yang JY, Zhang SY, Feng L. Feasibility to establish a mini-pig model of class II furcation defect. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(33): 6127-6130. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Chen Shan★, Master, Physician, Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China chenshan0001@163.com

Correspondence to: Yang Jun-ying, Master, Associate professor, Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China aliceyang2006@126.com

Supported by: Science and Technology Plan Program of Guangdong Province, No.2009B060700042\*

Received: 2011-04-06 Accepted: 2011-07-18

### 摘要

**背景:** 牙槽骨缺损再生的前提是建立可有效评价牙周骨组织再生的实验性牙槽骨缺损动物模型, 以往研究用于观察牙周组织病变的模型动物多选用狗, 但操作难度大。

**目的:** 观察利用小型猪建立II度根分叉缺损动物模型的可行性。

**方法:** 制备小型猪II度根分叉缺损模型。将小型猪实验牙随机分为2组, 模型组造模后不注射任何药物干预, 对照组于造模后注射具有成骨作用的辛伐他汀凝胶。

**结果与结论:** 建模8周后大体、病理切片观察结果均显示模型组根分叉区空虚, 对照组见新生牙槽骨长入。对照组可见较成熟的纤维组织以及增生的血管、大量成骨细胞、骨细胞, 而模型组可见增生血管及少量成骨细胞。结果证实, 以小型猪构建II度根分叉缺损模型是可行的。

**关键词:** 小型猪; II度根分叉缺损; 动物模型; 辛伐他汀; 牙槽骨; 牙组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.33.012

陈珊, 杨军英, 张盛炎, 冯磊. 建立小型猪II度根分叉缺损模型的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(33):6127-6130. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

由于牙根分叉区的解剖形态复杂, 给临床治疗带来一定的困难<sup>[1-2]</sup>。

过去常作为首选动物的狗的牙周解剖、组织病理学、微生物学及免疫学等都与人有极其相似之处, 但其缺点是由于价格昂贵, 饲养条件较高, 且实验操作难度很大, 难以进行多数量的实验观测。

有研究表明小型猪可以用于口腔医学研究<sup>[3]</sup>, 牙槽骨缺损再生的前提是建立可有效评价牙周骨组织再生的实验性牙槽骨缺损动物模型, 但关于利用小型猪建立II度根分叉缺损的动物模型至今少有报道, 同时近年来诸多研究报道辛伐他汀具有促进牙槽骨再生作用<sup>[4-5]</sup>。

实验选择与人类有较大相似性的五指山小

型猪作为研究对象, 以此建立II度根分叉缺损的动物模型。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于2009-06/12在中山大学动物实验中心, 中山大学生物化学实验室和中山大学医学统计教研室完成。

### 材料

**实验动物:** 健康雄性13月龄小型猪4只, 普通级, 体质量28.5~31.5 kg, 均购自广东温氏公司实验动物中心, 动物合格证号: SYXK(粤)2007-0081。动物均正常摄食和饮水, 光照条件良好, 正常室温条件下饲养。

实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[6]</sup>。

中山大学附属第一医院口腔科, 广东省广州市 510080

陈珊★, 女, 1983年生, 江苏省响水县人, 汉族, 2010年中山大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事牙体牙髓病及牙周病方面的研究。  
chenshan00001@163.com

通讯作者: 杨军英, 硕士, 副教授, 中山大学附属第一医院口腔科, 广东省广州市 510080  
aliceyang2006@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)33-06127-04

收稿日期: 2011-04-06  
收稿日期: 2011-07-18 (20101115026/WJ-S)

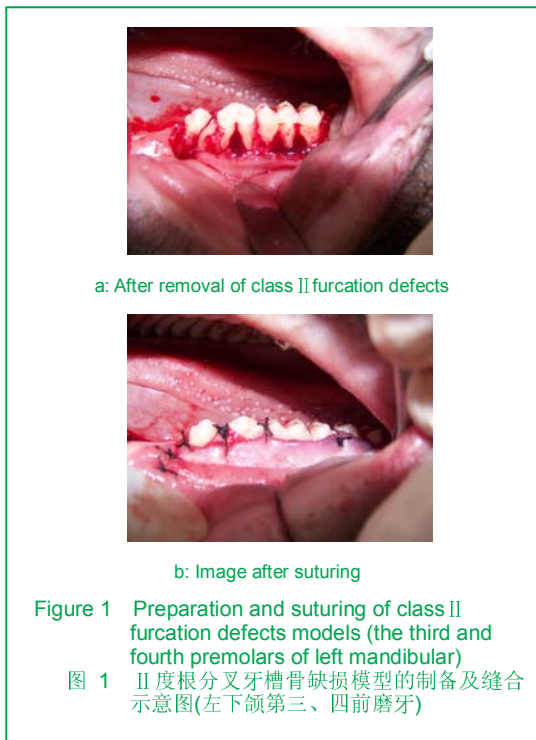
主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
甲基纤维素	广州市齐云生物科技有限公司
辛伐他汀原料药	广州南新制药有限公司
切片机	德国莱卡公司
光学显微镜	日本奥林巴斯公司

实验方法:

**辛伐他汀凝胶的制备:** 参考以往研究的方法<sup>[7-9]</sup>: 将40 g/L的甲基纤维素(4 000 cps)溶解到三蒸水中制备成甲基纤维素凝胶, 冷却至室温后作为辛伐他汀的载体。将辛伐他汀溶解于无水乙醇, 质量浓度50 g/mL, 然后加入到甲基纤维素凝胶中, 使辛伐他汀的终浓度达到实验所需质量浓度(0.044 g/mL), 磁力搅拌器搅拌均匀, 4 °C冷藏备用。

**II度根分叉缺损小型猪模型的建立及分组:** 所有实验动物经耳后肌肉垂直注射体积分数3%的戊巴比妥溶液(1 mL/kg)麻醉, 10~15 min后麻醉起效。将实验动物固定于动物手术台, 垫肩, 牵出舌头。消毒、铺巾后, 以小型猪上下颌两侧第三、四前磨牙(P3, P4)为实验牙, 在小型猪的手术区牙龈注射含1:100 000肾上腺素的阿替卡因注射液(必兰)1 mL。以手术牙为中心, 前后延伸1个牙位, 在上下颌第二前磨牙颊侧牙龈乳头近中和第一磨牙颊侧牙龈乳头远中做垂直切口, 用牙龈分离器翻开龈瓣, 充分显露手术牙颊侧的牙槽骨, 见图1。



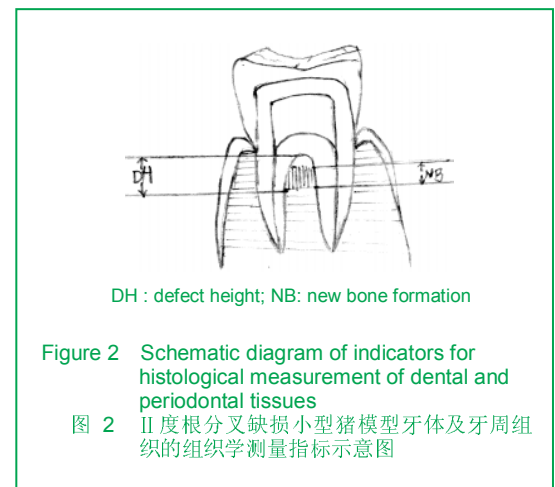
用骨凿去除实验牙颊侧牙槽骨暴露根分叉区, 再牙合龈向及颊舌向分别去除根分叉区内的牙槽骨5 mm, 制备成II度根分叉区牙槽骨缺损模型, 见图1a, 做根面平整, 体积分数3%双氧水及生理盐水冲洗, 后颊侧牙龈复位, 用盐水棉球在颊侧轻压, 使黏骨膜瓣与骨面紧密贴合, 用4号缝线间断缝合龈瓣, 见图1b。建模成功的标准是在根分叉区内有骨缺损但尚未相通, 用牙周探针可从水平方向不同深度地进入分叉区内。建模后不使用抗生素, 待动物麻醉苏醒后半流食喂养1周后常规喂养, 建模后1周拆线, 饲养8周<sup>[7, 10-12]</sup>。

建模成功后, 以每只小型猪上下颌两侧第3、4前磨牙为实验牙, 将4只小型猪共16颗实验牙随机分为2组: 模型组: 仅建立II度根分叉缺损模型, 不做任何预处理; 对照组: 从造模后开始, 在人工根分叉缺损处注入2.2 mg辛伐他汀凝胶, 每周注射1次, 50 μL/次, 注射后轻压组织瓣, 使其与骨面紧密贴合。

**II度根分叉缺损小型猪模型牙体及牙周组织的形态观察:** 各组动物于建模8周后处死。大体观察后, 以各实验牙为中心对硬组织制备牙及牙周组织块, 以体积分数10%甲醛溶液固定, 以备组织形态学观察。

主要观察指标:

**一般形态观察指标:** 实验前缺损高度(defect height, DH): 自釉牙骨质界至根方切迹底间距离; 新生牙槽骨(new bone formation, NB)高度: 自根方切迹至新生牙槽骨冠方顶间距离。具体测量指标详见示意图2。



**组织学观察指标:** 镜下观察新生骨小梁及哈弗氏系统、成骨细胞、骨细胞。用奥林巴斯BX51研究级显微镜, 在100倍数下取5个细胞最密集区, 在400倍数下数0个高倍视野中的细胞绝对

数。

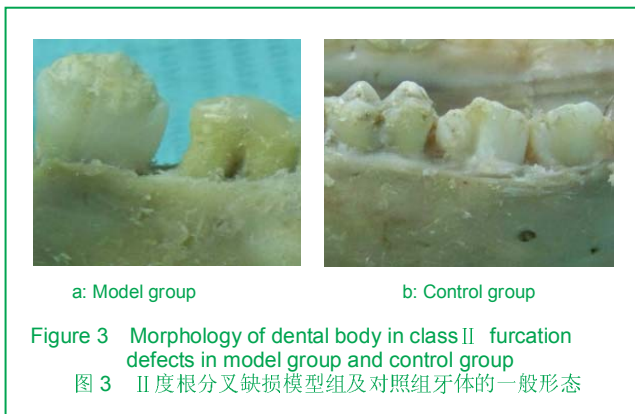
**统计学分析:** 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据分析, 组间数据差异比较采用单因素方差分析法, 组间多重均数差异的两两比较采用 SNK-*q* 检验, 检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 小型猪数量分析** 纳入小型猪 4 只, 均进入结果分析, 无死亡和感染, 无脱落。

**2.2 II 度根分叉缺损模型小型猪牙体及牙周组织的一般情况** 建模 8 周后处死动物之前, 动物健康状况良好。一般观察可见, 实验牙位均未见明显的软垢。牙龈无充血肿胀, 无探诊出血, 牙齿无明显松动。对照组动物实验牙未见明显的软垢, 个别牙龈稍充血肿胀, 无探诊出血, 牙齿无明显松动。

建模后 8 周, 去除所有实验动物软组织和黏骨膜暴露颌骨, 可见模型组根分叉区空虚, 基本无新生骨组织长入, 可见大量血管以及纤维结缔组织; 对照组新生骨基本长满缺损区域, 与周围骨组织无明显分界, 见图 3。



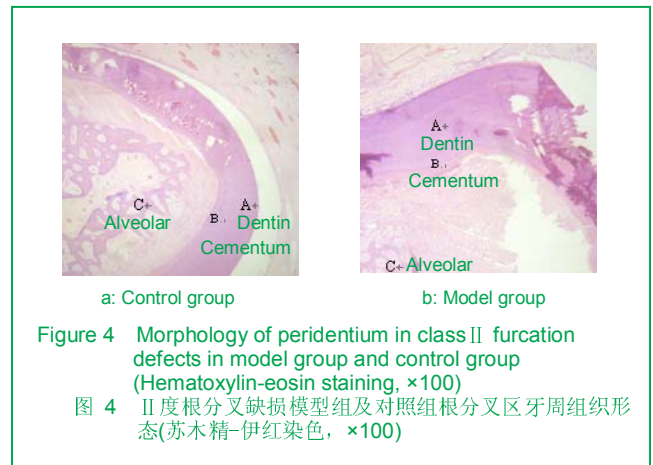
两组动物实验前缺损高度相比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 模型组新生牙槽骨高度低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

Group	DH (mm)	NB (mm)	NB from DH (%)
Model	5.18±0.19	1.18±0.36	22.54±6.28
Control	5.10±0.14	4.76±0.17 <sup>a</sup>	93.44±3.97 <sup>a</sup>

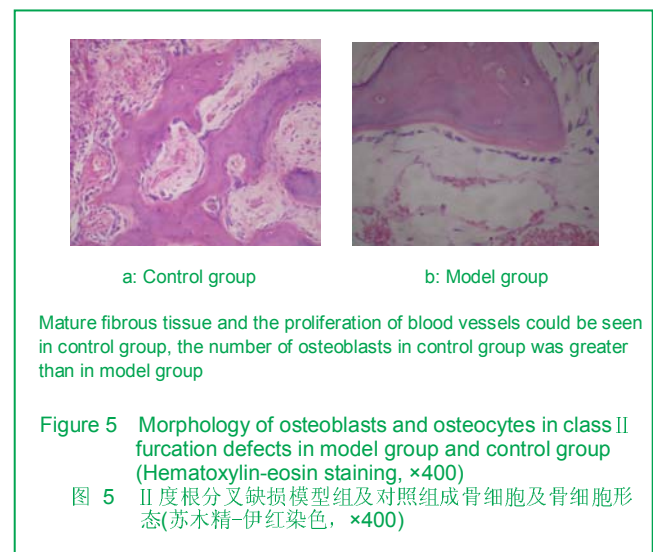
DH: defect height; NB: new bone formation; % NB from DH: percentage of new bone formation from defect height; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. model group

**2.3 II 度根分叉缺损模型组及对照组牙周组织学形态** 对牙及牙周组织块不脱钙用苏木精-伊红染色, 光镜下

观察可见: 对照组实验牙的新生牙槽骨几乎充满根分叉区, 可见骨小梁成网状结构及成熟的哈佛氏系统, 而模型组未见明显新生骨, 见图 4。



细胞计数结果显示, 对照组可见较成熟的纤维组织以及增生的血管。其成骨细胞数量 ( $81.40 \pm 3.06$ ) 多于模型组 ( $27.20 \pm 2.66$ ,  $P < 0.05$ )、骨细胞数量 ( $11.50 \pm 1.27$ ) 也多于模型组 ( $0.70 \pm 0.48$ ,  $P < 0.05$ ), 具体细胞形态见图 5。



## 3 讨论

实验的主要目的是观察外科手术是否可以成功建立小型猪根分叉 II 度缺损动物模型。牙槽骨缺损再生研究的前提是建立可有效评价牙周骨组织再生的实验性牙槽骨缺损模型, 逼真模拟机体病损部位, 为实验用药的注入提供有效空间<sup>[3, 13]</sup>。实验性牙周缺损动物模型建立过程中, 缺损的类型、大小和部位最为重要。有研究以狗和羊第一前磨牙用外科手术造成的急性缺损建立实验动物根分叉区牙槽骨缺损模型<sup>[12-13]</sup>。范月静等<sup>[14]</sup>

用小型猪成功建立前牙 I 壁骨袋模型进行牙周骨缺损的实验研究, 但用于建立根分叉区牙槽骨缺损的动物模型尚未见报道。实验参照以往研究方法, 选择小型猪前磨牙建立根分叉区人工牙槽骨急性 II 度缺损的模型<sup>[7, 10-12, 15]</sup>。因为小型猪前磨牙与人磨牙结构相似, 因此选择该区进行实验研究。结果可见, 8 周后模型组根分叉区未见明显新生牙槽骨, 且于高倍镜下仅见少量骨细胞及成骨细胞, 小型猪根分叉缺损模型建立成功, 在根分叉区内有骨缺损但尚未相通, 用牙周探针可从水平方向不同深度地进入分叉区内。实验的动物模型的数值稳定, 具有可比性、稳定性、有效性、可行性, 符合实验要求, 能模拟实际临床情况, 动物种类的选择是合理的。

实验的另一个目的是探讨小型猪是否是一种比较理想的用于建立根分叉 II 度缺损动物模型实验动物。小型猪的消化系统、骨骼结构及牙齿发育和牙周组织等都与人类相似, 且有乳牙与恒牙两牙列替换生长、发育, 牙的大小也与人类近似<sup>[16-18]</sup>。满足了选用相同种系和年龄相仿的实验动物, 符合牙周实验的重复性和可比性要求<sup>[13]</sup>。实验首次选用小型猪建立根分叉区牙槽骨缺损模型。麻醉后小型猪面部肌肉松弛, 体积小, 口裂大, 口张开容易, 口腔干燥, 实验操作相对容易。而且小型猪价格适中, 因此对于牙槽骨缺损的研究来讲, 小型猪是一种比较理想的实验动物, 满足了简单且易于重复的建立实验动物模型的重要原则, 对建立牙周炎预防和治疗研究的动物模型有重要意义。以往实验动物多采用大鼠<sup>[19]</sup>, 也有人选用狗<sup>[12]</sup>、羊及兔<sup>[10, 20]</sup>, 但这几种动物都有自己的不足。过去常作为首选动物的狗的牙周解剖、组织病理学、微生物学及免疫学等都与人有极其相似之处, 但其缺点是由于价格昂贵, 饲养条件较高, 且实验操作难度很大, 难以进行多数量的实验观测。还有很多实验研究动物采用大鼠、兔和羊等, 但这几种动物都有自己的不足。羊饲养条件难以满足, 大鼠和兔是啮齿动物, 体小牙小, 与人类差别较大, 不利于操作。

综上所述, 实验成功建立了 II 度根分叉缺损小型猪模型, 对于牙槽骨缺损的动物研究来讲, 小型猪是一种比较理想的实验动物。

#### 4 参考文献

- [1] Cao CF. Beijing Daxue Yixue Chubanshe. 2006. 曹采方. 临床牙周病学[M]. 第1版, 北京: 北京大学医学出版社, 2006.
- [2] Svadstrom G, Wennstrom JL. Periodontal treatment decisions for molars: An analysis of influencing factors and long-term outcome. J Periodontol. 2000;71(4):579-585.
- [3] Meng HX, Xie H, Chen ZB, et al. Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi. 1996;31(6):333-336. 孟焕新, 谢昊, 陈智滨, 等. 小型猪实验性牙周炎的观察[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(6):333-336.

- [4] Pradeep AR, Thorat MS. Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. J Periodontol. 2010;81(2):214-222.
- [5] Pauly S, Luttosch F, Morawski M. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. Bone. 2009; 45(3): 505-511.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [7] Stein D, Lee Y, Schmid MJ, et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. J Periodontol. 2005; 76(11):1861-1870.
- [8] Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. J Periodontol. 2002;73(10): 141-148.
- [9] Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009;14(9):485-488.
- [10] Danesh-Meyer MJ, Pack ARC, McMillan MD. A comparison of 2 polytetrafluoroethylene membranes in guided tissue regeneration in sheep. J Periodontol Res. 1997;32(1):20-30.
- [11] Sao Y, Kikuchi M, Ohata N, et al. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. J Periodontol. 2004;75(2):243-248.
- [12] Morris MS, Lee Y, Lavin MT, et al. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. J Periodontol. 2008;79(8):1465-1473.
- [13] Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, et al. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. Biomaterials. 2008;29(12):1940-1949.
- [14] Fan YJ, Wang CL, Wang Y. Zhonghua Kouqiang Yixue Yanjiu Zazhi. 2010;4(2):114-119. 范月静, 王春兰, 王英. 骨形成蛋白与胶原基纳米骨修复牙周骨缺损的实验研究[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2010, 4(2):114-119.
- [15] Novaes ABJ, Tamani JP, Oliveira PT, et al. Root trunk concavities as a risk factor for regenerative procedures of class II furcation lesions in dogs. J Periodontol. 2001;72(5):612-619.
- [16] Xu CJ. Guoji Kouqiang Yixue Zazhi. 2006;33(4):263-266. 许春斌. 牙周组织工程实验性牙周缺损模型的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2006, 33(4):263-266.
- [17] Schook L, Beattie C, Beever J, et al. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. Animal Biotechnol. 2005;16(2):183-190.
- [18] Jiang ZH, Max FR. Swine genome science comes of age. Int J Biol Sci. 2007;3(3):129-131.
- [19] Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, et al. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. J Oral Rehabil. 2010;37(2):123-130.
- [20] Chissas D, Stamatopoulos G, Verettas D, et al. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. Injury. 2010;41(7):761-766.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 课题受广东省科技计划项目 (2009B060700042) 资助, 项目名称: 辛伐他汀局部给药缓释剂型的研制及其对牙槽骨重建的作用。

**作者贡献:** 杨军英和陈珊进行实验设计, 实验实施为陈珊和冯磊, 实验评估为张盛炎, 资料收集为张盛炎, 陈珊成文, 杨军英审校, 杨军英对文章负责。

**致谢:** 感谢广州南新制药有限公司给予辛伐他汀原料药的支持, 感谢广州番禺中心医院病理科李晶给予本实验病理技术支持。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验使用实验动物已通过中山大学附属第一医院伦理委员会批准(伦审[2010]11号)。

**本文创新性:** 课题设计的创新之处为利用小型猪建立根分叉 II 度缺损动物模型, 说明小型猪是一种比较理想的实验动物。