

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.25.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 25-0001-05

基础研究 · 论著

雌激素水平对大鼠实验性牙周炎模型的影响*

王翔宇¹, 孙克勤¹, 王毅², 刘佳佳¹, 史晓彤¹

[1. 山西医科大学口腔医学院 (口腔医院), 山西 太原 030001;
2. 山西省太原市第二人民医院 口腔科, 山西 太原 030002]

摘要: 目的 研究雌激素水平对雌性大鼠实验性牙周炎模型牙周组织的影响。**方法** 取雌性未孕 SD 大鼠 33 只, 并随机分为假手术组 (Sham 组)、去势组 (OVX 组) 和去势加雌激素组 (OVX+E 组), 适应性喂养后对各组雌性大鼠行双侧卵巢切除术或假手术。OVX+E 组术后每 3 天注射 1 次雌二醇 (E2)。利用钢丝结扎右侧上颌磨牙的方法复制慢性牙周炎动物模型, 左侧大鼠牙齿留作对照, 不做处理。通过检测血清 E2 水平, 观察临床表现和 HE 切片, 比较牙周结扎术后第 2、4、6 周各组大鼠牙周炎的进展情况。**结果** 随着时间的延长, OVX 组的 E2 水平逐渐降低, Sham 组和 OVX+E 组的 E2 水平基本维持不变。各组牙周探诊程度逐渐加深, OVX 组较 Sham 组和 OVX+E 组牙周炎较重。**结论** 雌激素水平的高低会影响牙周炎的病理发展过程, 内源性雌激素的缺乏会加重大鼠牙周炎的程度。

关键词: 雌激素; 牙周炎; 去势大鼠模型

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of estrogen level on experimental periodontitis model in rats*

Xiang-yu Wang¹, Ke-qin Sun¹, Yi Wang², Jia-jia Liu¹, Xiao-tong Shi¹

[1. Stomatology College (Stomatology Hospital), Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Stomatology, the Second People's Hospital, Taiyuan, Shanxi 030002, China]

Abstract: Objective To study the effect of estrogen on periodontal tissue of rats with experimental periodontitis. **Methods** Thirty-three female non-pregnant SD rats were randomly divided into a sham operation group (sham group), an ovariectomized group (OVX group) and an OVX+estrogen group (OVX+E group). After adaptive feeding, the female rats of each group underwent sham operation or bilateral oophorectomy respectively. Estradiol was injected postoperatively every three days in the OVX+E group. The animal model of chronic periodontitis was established by ligating the right maxillary molars with the wire, and the teeth of the left side of the rats were taken as control and not treated. Through the detection of serum E2 level, and observation of the clinical manifestations and HE sections, the development of periodontitis in the rats was compared after 2, 4 and 6 weeks. **Results** With the progress of time, the level of E2 in the OVX group decreased gradually, the level of E2 in the sham group and the OVX+E group remained unchanged. In each group, the level of periodontal probing gradually deepened, and the degree of periodontitis in the OVX group was higher than that in the sham group and the OVX+E group. **Conclusions** The level of estrogen can affect the pathological development of periodontitis, and the

收稿日期: 2017-11-15

* 基金项目: 山西省自然科学基金计划资助项目 (No: 2014011046-3); 山西省高等学校科技创新项目资助 (No: 2013121); 山西省研究生联合培养基地人才培养项目 (No: 2017021)

[通信作者] 孙克勤, E-mail: wcy123698@163.com

deficiency of endogenous estrogen may increase the degree of periodontitis.

Keywords: estrogen; periodontitis; ovariectomized; rat model

牙周病是成人缺牙失牙的重要原因之一^[1], 病因复杂, 其始动因子是牙菌斑, 除此之外一些全身因素等对牙周病的发展也有一定的影响。人体当中存在的雌激素有雌三醇 (E3)、雌二醇 (E2) 和雌酮 (E1), 其中 E2 活性最强。研究发现^[2], 雌激素上调骨保护因子的表达并下调牙周膜干细胞骨向分化时核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 的表达, 抑制破骨细胞的功能。雌激素通过受体作用于靶器官^[3], VITTEK 等^[4]首次发现人的牙龈组织也存在雌激素受体 (estrogen receptor, ER), 证明牙周组织是雌激素重要的靶器官。牙周炎的发生、发展过程中雌激素水平低下起到重要作用^[5]。研究表明^[6], 正常女性唾液中雌激素的水平较女性牙周炎患者高, 低雌激素水平患者服用含高浓度 E2 的固齿丸后, 牙周炎症状明显减轻。目前, 针对雌激素对牙周炎细胞的影响这一方面的研究尚未深入。

本研究在复制去势大鼠牙周炎模型的基础上, 探讨牙周炎发展过程中临床表现和组织病理学的改变, 为探索牙周病的发病机制提供新的资料, 进而为寻找有效的防治牙周病的方法提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌性 SD 大鼠 (山西医科大学动物中心提供), 17β -E2 (美国 Sigma 公司), 大鼠 ER 检测试剂盒 (山东省成武县医用制品厂), 电热恒温干燥箱 (天津市华北实验仪器有限公司), 隔水式电热恒温培养箱 (Well wash 4MK2, 上海跃进医疗器械公司), 微量电动组织匀浆器 (0.1 ~ 50.0 m, 美国 KIMBLE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及动物模型的复制 ①动物分组: 雌性 SD 大鼠 33 只, 3 个月龄, 体重 220 ~ 240 g, 并随机分为去势组 (OVX 组)、假手术组 (Sham 组) 和去势加雌激素组 (OVX+E 组), 每组 11 只, 常规饲养。②复制雌鼠慢性牙周炎模型: 雌鼠适应性喂养 1 周后, OVX 组和 OVX+E 组行卵巢摘除术, Sham 组仅做打开、关闭腹腔手术, 并不切除双侧卵巢。去势手术及假手术后第 2 天起, OVX+E 组雌性大鼠腹腔皮下注射 17β -E2; 其余两组大鼠在同一时间腹腔皮下注射

同等体积的生理盐水。3 组大鼠常规喂养, 正常饮水。在术后第 3 周, 对 3 组大鼠右侧上颌第一磨牙进行牙周结扎术, 对侧牙齿不作处理, 作为同体对照侧。自醒, 用普通饲料喂养大鼠。③大鼠内眦静脉血的采取与测定: 大鼠牙周结扎手术后第 2、4、6 周分别取各组大鼠内眦静脉血约 4 ml, 收集血液对血清离心并检测, 对检测结果进行统计分析。

1.2.2 观察指标及方法 ①血清 E2 水平: 在大鼠进行牙周结扎手术前以及双侧卵巢去除术后第 2、4、6 周分别抽取 3 组大鼠内眦静脉血, 测量其血清 E2 水平。②临床观察: 在牙周手术后第 2、4、6 周检查各组大鼠口腔牙周组织的状况, 并对 3 组大鼠牙周炎进程进行比较。③组织学观察: 3 组大鼠在牙周结扎手术后 2、4、6 周每组随机抽取 4 只大鼠断头处死, 取大鼠两侧上颌第一磨牙及其牙周组织的上颌骨标本。脱钙后脱水, HE 染色, 光学显微镜下观察各组大鼠牙周组织的变化情况。

1.2.3 牙周得分标准 0 分: 牙龈健康, 无炎症及出血, 无牙周袋; 1 分: 牙龈颜色有炎症改变, 轻度水肿充血, 点彩不明显, 探诊少量出血; 2 分: 牙龈质地松软, 龈乳头圆钝肿胀, 龈沟加深且探诊有出血; 3 分: 牙龈质地变软且边缘圆钝, 颜色发红, 探诊出血, 牙周探针可探 0.6 mm 左右的浅牙周袋; 4 分: 龈乳头水肿糜烂, 牙龈发红, 探诊后有出血, 牙周探针可探 0.8 mm 左右的牙周袋; 5 分: 腭侧龈缘黏膜糜烂坏死, 牙龈深红色, 探诊后出血严重, 可探及 1.0 mm 左右的牙周袋; 6 分: 牙龈萎缩, 龈乳头糜烂, 暴露出牙根, 牙齿 II 度松动, 可探及 >1.5 mm 的牙周袋且牙周袋溢脓。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 比较用重复测量设计的方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠血清 E2 水平的比较

3 组大鼠牙周结扎手术前, 与牙周结扎手术后第 2、4、6 周的血清 E2 水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果显示: ① 3 组间的 E2 水平有差异

($F=26.799, P=0.000$); ②不同时间点的 E2 水平有差异 ($F=336.238, P=0.000$); ③ 3 组的 E2 水平变化趋势有差异 ($F=222.038, P=0.000$)。进一步两两比较 E2 水平, OVX 组与 Sham 组比较差异有统计学意义 ($P=0.001$), OVX 组与 OVX+E 组比较差异有统计学意义 ($P=0.003$), Sham 组与 OVX+E 组比较差异无统

计学意义 ($P=0.263$)。见表 1。

在牙周手术后 2、4、6 周, OVX+E 组和 Sham 组的血清 E2 水平基本保持不变, 且两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$), OVX 组血清 E2 水平逐渐降低, 且 OVX 组血清 E2 水平均低于其余两组 ($P=0.001$ 和 0.003)。见图 1。

表 1 3 组大鼠血清 E2 水平比较 ($n=11, \text{pg/ml}$)

组别	术前	术后第 2 周	术后第 4 周	术后第 6 周
Sham 组	52.47 ± 0.87	52.52 ± 0.77	52.89 ± 0.84	53.42 ± 1.01
OVX 组	53.29 ± 0.74	23.84 ± 1.29	15.99 ± 0.53	1.75 ± 0.22
OVX+E 组	52.37 ± 0.72	52.85 ± 0.64	53.53 ± 1.83	53.50 ± 0.82

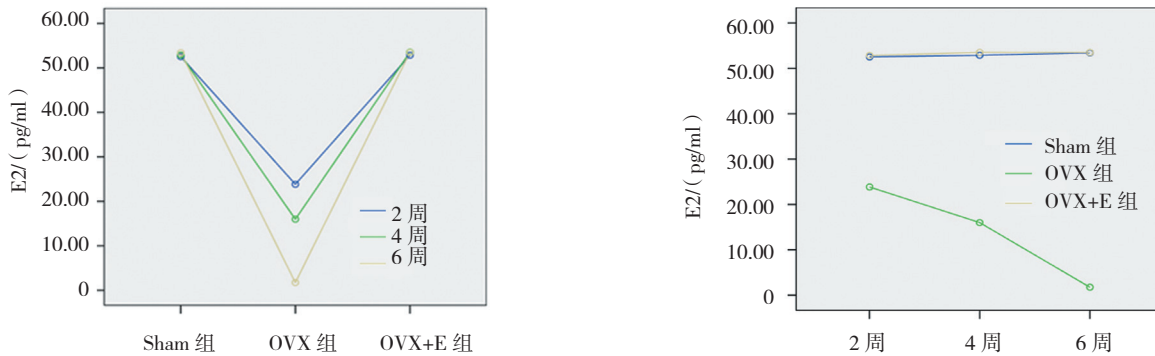


图 1 3 组大鼠血清 E2 水平在不同时间的变化趋势

2.2 3 组大鼠牙周结扎术后 2、4、6 周临床表现

3 组大鼠均出现不同程度的牙龈炎和牙周炎的临床表现, 病变程度随时间变化加重, OVX 组较其余两组严重。OVX 组的 E2 水平较其余两组低, Sham 组和 OVX+E 组 E2 水平无明显差异。牙周结扎术后 2、4、6 周 3 组大鼠的临床表现得分情况见表 2。

表 2 3 组大鼠的临床表现得分情况 ($n=11, \text{分}$)

组别	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
Sham 组	1	3	4
OVX 组	2	5	6
OVX+E 组	1	4	5

2.3 3 组大鼠组织学情况比较

牙周结扎手术 2、4、6 周后对各雌鼠标本 HE 染色, 光镜下观察病理表现: 牙周结扎术 2 周后, Sham 组大鼠结合上皮中出现炎症细胞, 牙龈纤维结缔组织有少量增生 (见图 2A); OVX 组大鼠牙龈纤维组织水肿明显, 结缔组织中有大量中性粒细胞浸润, 结合上皮钉

突增生且有大量中性粒细胞浸润, 牙周膜排列整齐 (见图 2B); OVX+E 组大鼠纤维结缔组织水肿, 且毛细血管增生扩张 (见图 2C)。牙周结扎术 4 周后, Sham 组大鼠纤维结缔组织水肿增生, 牙龈结合上皮钉突变性而且明显增生 (见图 3A); OVX 组大鼠形成了牙周袋, 牙周袋壁有大量炎症细胞浸润, 纤维结缔组织增生, 出现大量淋巴细胞, 牙周膜胶原纤维变性坏死 (见图 3B); OVX+E 组大鼠牙周袋壁有大量的炎症细胞浸润, 纤维结缔组织增生水肿 (见图 3C)。牙周结扎术 6 周后, Sham 组大鼠牙周袋变深, 纤维结缔组织增生明显且内有大量中性粒细胞浸润 (见图 4A); OVX 组大鼠结合上皮中有大量中性粒细胞浸润, 上皮向下迁移形成深的牙周袋, 结缔组织内的胶原纤维和基质被大量炎症细胞浸润并发生变性 (见图 4B); OVX+E 组大鼠牙周袋加深, 袋壁内有大量炎症细胞浸润, 牙周膜内的胶原纤维变性并开始出现降解, 结缔组织内开始出现淋巴细胞 (见图 4C)。

3 组大鼠标本进行 HE 染色观察, 其严重程度不同, OVX 组较其余两组严重, OVX+E 组较 Sham 组牙周炎



图 2 3组大鼠牙周结扎术后 2 周病理图 (HE 染色 × 200)



图 3 3组大鼠牙周结扎术后 4 周病理图 (HE 染色 × 200)

程度稍严重。

本实验中采用的是同一只大鼠左右两侧相对照的方法，大鼠左侧上颌第 1 磨牙没有进行牙周结扎手

术，对照侧的 3 组大鼠的牙周组织在临床表现以及病理表现并无明显的差异。见图 5。

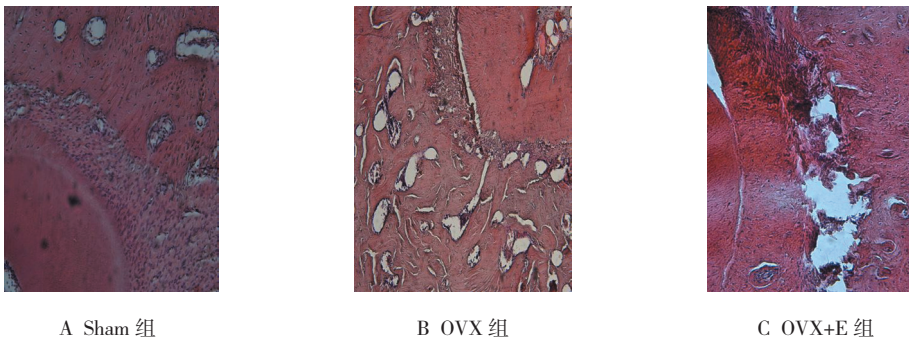


图 4 3组大鼠牙周结扎术后 6 周病理图 (HE 染色 × 200)

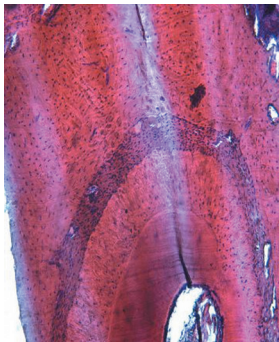


图 5 牙周结扎术后对照侧病理图 (HE 染色 × 200)

3 讨论

本实验选用大鼠用于牙周病的实验研究，成功复制去势大鼠牙周炎的动物模型。本实验严格控制实验条件以减少额外变量对结果的影响。通过观察雌性大鼠右侧上颌第 1 磨牙牙周组织临床表现并进行 HE 染色观察大鼠牙周炎进展过程中组织细胞学的变化，研究讨论雌性大鼠牙周炎病程发展中牙周组织发生的改变。对 3 组大鼠在牙周结扎术后分别进行临床观察，在术后第 2、4、6 周观察到 3 组大鼠结扎侧（右侧）

都表现出了不同程度的牙周炎的症状, 而且随着时间的推移, 发现 OVX 组大鼠在实验过程中临床表现展现出牙周病从发生到发展一个连续的病理过程。结扎术后 2 周大鼠表现出牙龈炎早期的临床表现, 此时牙槽骨和牙周膜的结构并没有破坏, 仅仅表现为牙龈红肿, 结缔组织内有大量中性粒细胞浸润; 结扎术后 4 周大鼠表现出严重的牙周组织炎症反应, 牙周膜胶原纤维结构被破坏, 牙龈红肿糜烂, 溃疡形成, 结缔组织内开始有淋巴细胞浸润, 牙槽骨开始有吸收; 结扎术后 6 周大鼠表现出重度牙周病的临床症状, 结合上皮中有大量中性粒细胞浸润, 牙周袋形成, 牙槽骨明显吸收。OVX 组牙周炎病变程度较其余两组严重, 提示大鼠牙周炎的病变程度加重可能是由于血清雌激素水平的降低导致的。本实验严格控制非实验变量的其他额外因素, 说明 OVX 组血清雌激素的低水平使其牙周病临床症状加重。雌激素对女性而言是一种非常重要的激素, 可以调节成骨细胞和破骨细胞的数量从而促进骨形成或者骨吸收, 血清雌激素低下会破坏骨吸收与骨形成之间的平衡, 导致绝经期妇女容易患骨质疏松症^[7]。在去势动物模型研究中发现, 其牙周干细胞增殖分化能力降低, 导致其颌骨骨密度下降, 引起牙周炎的发生^[8-9]。本研究中, 虽然 Sham 组和 OVX+E 组的大鼠表现出一些牙周炎的临床症状, 但是 OVX 组在 3 个时间段牙周炎的临床症状比 OVX+E 组严重, 而 Sham 组临床牙周炎的症状比 OVX+E 组的症状轻微。这表明血清雌激素水平降低会促进牙周炎的发展, 加重牙周炎的症状, 促进牙周组织的破坏, 雌激素替代疗法对治疗绝经后妇女的牙周病有一定疗效^[10-11], 补充雌激素之后, 牙周组织附着丧失量明显减少^[12]。

参 考 文 献:

- [1] 曹采芳. 牙周病学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [2] 唐晓琳, 孟焕新, 张立, 等. 17- β 雌二醇对人牙周膜细胞骨向分化时核因子 κ B 受体激动子配体和骨保护因子表达的影响 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2007, 39(1): 50-55.
- [3] ZHANG B, LI Y, ZHOU Q, et al. Estrogen deficiency leads to impaired osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in rats[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 223(3): 177-186.
- [4] VITTEK J, HERNANDEZ M R, WENK E J, et al. Specific estrogen receptors in human gingival[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1982, 54(3): 608-612.
- [5] XIONG H F, PENG B, WEI L L, et al. Efectofan estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periodontal lesions in rats[J]. J Endod, 2007, 33(11): 1304-1308.
- [6] 丁一, 张举之. 女性牙周炎患者服用固齿丸前后唾液孕酮、雌二醇水平的变化 [J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 4(2): 88-90.
- [7] YOKOSE S, ISHIZUYA T, IKEDA T, et al. An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats[J]. Endocrinology, 1996, 137: 469-478.
- [8] MAMALIS A, MARKOPOULOU C, LAGOU A, et al. Oestrogen regulates proliferation, osteoblastic differentiation, collagen synthesis and periostin gene expression in human periodontal ligament cells through oestrogen receptor beta[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(5): 446-455.
- [9] WATTANAROONWONG N, SCHOENMAKER T, DE VRIES T. J., et al. Oestrogen inhibits osteoclast formation induced by periodontal ligament fibroblasts[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(3): 212-219.
- [10] 鄢明明, 刘泓, 冯占军, 等. 实验性牙周炎雌、孕激素受体免疫组织化学观察 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(1): 45-48.
- [11] MORISHITA M, YAMAMURA T, SHIMAZU A, et al. Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells[J]. J Clin Periodontol, 1999, 26(11): 748-751.
- [12] RONDEROS M, JACOBS D R, HIMES J H, et al. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANESII[J]. J Clin Periodontol, 2000, 27(10): 778-786.

(张蕾 编辑)