

口腔角化软组织缺损兔模型的建立与评估

王磊¹ 范亚伟^{2*}

(1. 山西医科大学口腔医学系 山西 太原 030001;

2. 山西医科大学第一医院口腔科 山西 太原 030001)

[摘要] 目的:构建一个具有科学性、重复性、相似性、可靠性、标准化的口腔角化软组织缺损动物模型,并对其形态学和组织学特征进行评估。方法:12 只 3 月龄雄性日本大耳白兔,随机分为 3、7、14 d 和 21 d 组($n=3$)。在硬腭中 1/3 中份,距上颌牙 10 mm 和两侧黏膜边缘 2.5 mm 处制备 10 mm 角化黏膜缺损。术中随机挑选三块切取下来的组织块作为对照组。测量各组缺损组织块的平均厚度,排除因其厚度不同所带来的误差。分别于术后 3、7、14、21 d 进行大体观察和创面愈合率分析,并于术区取材后行 HE 染色和 VG 染色,观察其炎症反应、上皮的修复和胶原纤维的合成状况。结果:大体观察:3 d 炎症最重,随后炎症逐渐减轻,缺损组织逐渐恢复。组织学观察:3 d 炎症细胞最多,术后 7 d,细胞不断增殖,肉芽组织大量形成,角化上皮和纤维结缔组织开始逐渐恢复。各组缺损的平均厚度无统计学差异。愈合率:3 d<7 d<14 d<21 d($P<0.01$)。炎症等级评分:3 d 和 7 d 分别都高于对照组($P<0.05$)。上皮平均厚度:14 d 小于对照组和 21 d($P<0.05$)。胶原纤维的密度评分:3 d 和 7 d 都低于对照组($P<0.05$),21 d 高于对照组($P<0.05$)。结论:成功建立了口腔角化软组织缺损动物模型,为后续研究促进口腔角化软组织修复的方法、材料和机制奠定了基础。

[关键词] 创伤愈合 动物模型 兔 硬腭 结缔组织

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)05—0567—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.05.025

Establishment and Evaluation of A Rabbit Model of Oral Keratinized Soft Tissue Wound. WANG Lei¹, FANG Ya-wei^{2*}. 1. School of Stomatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Stomatology, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

[Abstract] **Objective:** To establish an animal model of oral keratinized soft tissue wound with scientificness, repeatability, comparability, reliability, and standardization, and to evaluate its morphology and histology. **Methods:** 3-month-old male Japanese rabbits were divided randomly into 4 groups: 3d, 7d, 14d and 21d groups ($n=3$). Keratinized soft tissue wound was generated by using a punch-biopsy instrument (diameter 10mm) at the middle third of hard palate, respectively far from bilateral mucosal margin 2.5mm, and away from maxillary teeth 10mm. Three soft tissues were randomly chosen and cut as control group. Gross observation and wound healing analysis were performed after 3, 7, 14, and 21 days. HE staining and VG staining were used to observe inflammatory reaction, healing of the epithelial thickness, and collagen formation, after collected the specimen on the surgery area. **Results:** Gross observation: the inflammatory reaction after 3 days was the most severe. As time went by, the wound was gradually healed. Histological observation: the number of inflammatory cells was the most after 3 days. Keratinized epithelium and fibrous connective tissue were gradually healed after 7 days, with cell proliferation and formation of granulation tissue. The wound thickness in each group had no statistical difference. The wound healing rate: 3d<7d<14d<21d ($P<0.01$). The grades of inflammatory reaction of both 3d and 7d groups were higher than those of control group, 14d, and 21d groups ($P<0.05$). The average epithelial thickness of 14d group was narrower than those of control group and 21d group ($P<0.05$). The grades of the density of collagen fibres of both 3d and 7d groups were lower than that of control group ($P<0.05$), and that of 21d group was higher than that of control group ($P<0.05$). **Conclusion:** An animal model of oral keratinized soft tissue wound was successfully est-

作者简介 王磊(1990~),男,重庆人,硕士在读,主要从事口腔种植体周围软组织的研究。

* **通讯作者** 范亚伟, E-mail: yawei@163.com

ablished, which laid a foundation for researching the way, the material, and the mechanism of promoting healing of oral keratinized soft tissue in the future.

[Key words] Wound healing Animal model Rabbits Hard palate Connective tissue

在临床种植的过程中,种植术区角化软组织量不足会导致软组织一种植体生物学封闭的破坏,而后外源性有害物质趁机侵入,进而造成牙龈退缩、附着丧失和骨质暴露,最终导致种植手术的失败^[1~3]。传统的腭黏膜移植术可以解决种植区角化软组织不足,但其创伤较大、易发生感染且需要第二术区^[4]。为此众多学者开始探索实现种植区软组织增量的新技术和新材料。因此本实验旨在为该领域的研究构建一个具有科学性、重复性、相似性、可靠性、标准化的标准化动物模型。

本实验首次选用 10 mm 的标准造模工具在日本大耳白兔硬腭区制备了直径为 10 mm 的圆形角化软组织缺损,既保证了造模工具的标准一致性又克服了角化软组织缺损量不足、观察时间不充分和大型动物资金昂贵、难以管理的难题。该模型的成功建立,为后续研究促进口腔角化软组织修复的方法、材料和机制奠定了基础。

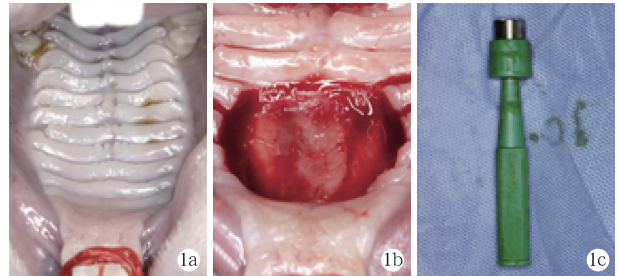
1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 3 月龄雄性日本大耳白兔 12 只,体重 2.5~3 kg,由北京市昌扬西山养殖场提供。实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-007。根据处死时间点将动物分为 3、7、14 d 和 21 d 组($n=3$)。术中随机挑选 3 块切取下来的组织块作为对照组。

1.2 主要实验材料与试剂 10 mm 皮肤环形切取器(圣诺图公司)、牙周探针(上海康桥)、单反(Canon 70D)、VG 染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.3 建模及组织处理 1%戊巴比妥钠按 3 ml/kg 的剂量经耳缘静脉实施麻醉。待麻妥后固定于兔台。每只兔的口周和口内常规碘伏消毒,拉钩打开口角,充分暴露硬腭(图 1a)。在硬腭中 1/3 中份处,距上颌门齿 10 mm,左右硬腭黏膜边缘 2.5 mm 位置,用直径为 10 mm 皮肤环形切取器制备角化黏膜缺损(图 1b 和图 1c)。术中纱布压迫止血半小时。术前 2 h 和术后连续 3 d 肌肉注射青霉素钠(10 万 U/kg),1 次/d,预防感染。术后 3、7、14、21 d 切取缺损处及 2 mm 范围内正常硬腭角化黏膜组织。所有组织块常规固定和包埋后以 3 μ m 厚度切片,之后行 HE 染色和 VG 染色。

1.4 模型建立的标准 10 mm 直径的圆形黏骨膜瓣缺损完整地从小兔硬腭上剥离。



1a:正常兔硬腭黏膜;1b:角化软组织缺损模型;1c:10 mm 皮肤环形切取器

图 1 动物模型建立

Fig. 1 Establishment of an animal soft tissue wound model.

1.5 软组织缺损平均厚度的测定 游标卡尺测量建模时切下来的圆形硬腭黏膜的左右、内外和中心的厚度,取平均值作为各组的硬腭黏膜的厚度。

1.6 大体观察和创面愈合率的测定 肉眼观察创面愈合情况。各组实验兔处死后,在给定标准长度(牙周探针)的前提下,利用三脚架和水平仪保证单反垂直与组织创面进行拍摄。ImagePlus6.0 软件测量愈合率。 $R=(S_{初}-S_{末})\div S_{初}$ 。R 为愈合率, $S_{初}$ 为初始创面面积, $S_{末}$ 为未愈合的创面面积。

1.7 组织学观察

1.7.1 炎症等级 HE 染色切片 40 倍、100 倍及 400 倍镜下对炎症细胞计数后给予炎症评分测定。0 分:无炎症;1 分:少量炎细胞浸润;2 分:介于 1 和 3 分之间;3 分:大量炎细胞浸润。

1.7.2 上皮平均厚度的测定 HE 染色切片 100 倍镜下,用 ImagePlus6.0 软件测量软组织缺损的上皮厚度。每张切片采集 3 张图像,每张图像在 10 个不同部位测量并取平均值。

1.7.3 胶原纤维密度的评分 VG 染色切片 400 倍镜下对胶原纤维密度进行评分测定。1 分:基本无胶原纤维;2 分:稀疏;3 分:介于 2 和 4 分之间;4 分:致密;5 分:非常致密。

1.8 统计分析 用 SPSS19.0 软件对各项指标进行统计和分析。炎症等级和胶原纤维密度评分采用 Mann-Whitney 秩和检验,其他指标采用单因素方差分析。 $\alpha=0.05, P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

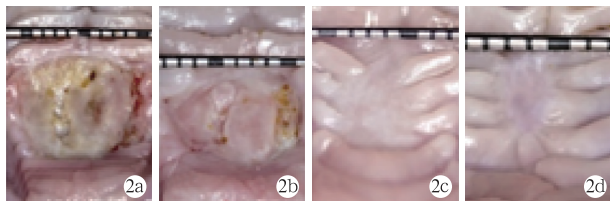
2.1 软组织缺损平均厚度测定 各组间软组织缺损平均厚度均无统计学差异($P<0.05$),见表 1。说明模型建立中各组间软组织缺损厚度基本一致,可以进行后续实验。

表 1 软组织缺损的平均厚度

Table 1 The average thickness of soft tissue wound

组别	平均厚度 mm, $\bar{x} \pm s$
3 d	1.94 ± 0.17
7 d	1.88 ± 0.40
14 d	1.91 ± 0.43
21 d	1.85 ± 0.18

2.2 大体观察 正常兔硬腭角化黏膜颜色粉红偏白,中后份腭皱欠发达(图 1a)。3d 组,创缘红肿,炎症明显,有黄色渗出物(图 2a)。7 d 组,创缘稍红,炎症减轻,创面进一步缩小,可见较多肉芽组织(图 2b)。14 d 组和 21 d 组,创面黏膜与周围正常黏膜颜色近似,创面凹陷不断填平,创缘周围可见一定的瘢痕挛缩(图 2c 和图 2d)。



2a~2d 分别为 3、7、14 d 和 21 d 缺损处黏膜状态

图 2 各组口腔角化软组织缺损愈合情况

Fig. 2 Healing of oral keratinized soft tissue wound in each group.

2.3 创面愈合率 缺损组织 3d 愈合率较低,从 7 d 开始创面愈合速度加快,14 d 近 2/3 创面已经愈合,但 21 d 仍有少部分未愈合。各组间愈合率统计学差异显著($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组角化软组织缺损愈合率

Table 2 The healing rate of keratinized soft tissue wound in each group

组别	愈合率 %, $\bar{x} \pm s$
3 d	12.92 ± 2.47
7 d	30.55 ± 4.46
14 d	67.63 ± 5.19
21 d	90.64 ± 0.95

注:各组间愈合率统计学差异显著, $P < 0.01$

2.4 组织学观察

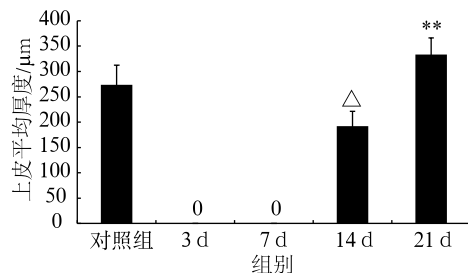
2.4.1 正常兔硬腭中 1/3 处黏膜上皮被覆复层鳞状上皮,以正角化为主,上皮钉突长而突,固有层由纤维结缔组织构成(图 3e)。3 d 组,基本全部为坏死组织,无完整的上皮及固有层形态,结缔组织松弛呈网状,伴有组织水肿、血管充血、炎症细胞大量浸润(图 3a)。7 d 组,大部分仍为坏死组织,炎症浸润明显,少量上皮及固有层开始形成,可见新生血管和肉芽组织(图 3b)。14 d 组,黏膜基本完整,炎症反应明显减轻,角化明显,固有层纤维增粗变密。(图 3c)。21 d 组,组织改建继续进行,上皮增厚,固有层纤维粗大而致密,排列杂乱无章(图 3d)。7 d 和 14 d 都残留有未完全修复的上皮和结缔组织。

表 3 炎症等级评分

Table 3 The grade of the inflammatory reaction

组别	0 分	1 分	2 分	3 分	P 值
对照组	3	0	0	0	—
3 d	0	0	0	3	0.025
7 d	0	0	1	2	0.034
14 d	2	1	0	0	0.317
21 d	2	1	0	0	0.317

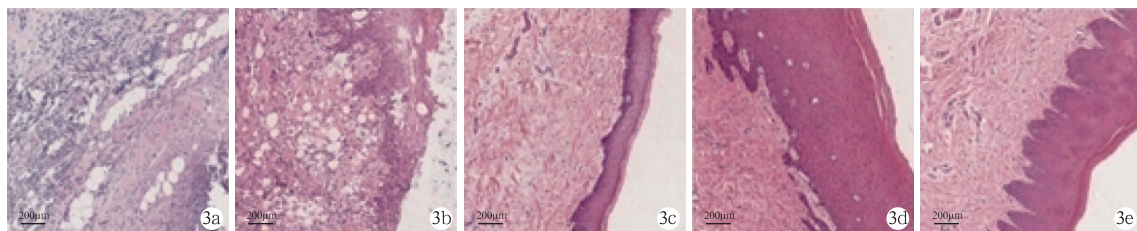
2.4.2 炎症等级 3 d 组和 7 d 组分别都大于对照组($P < 0.05$),14 d 和 21 d 组与对照组无统计学差异,其他组间无统计学差异,见表 3、图 3。



** 代表 14 d 与 21 d 统计学差异显著($P < 0.01$), Δ 代表 14 d 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)

图 4 上皮平均厚度

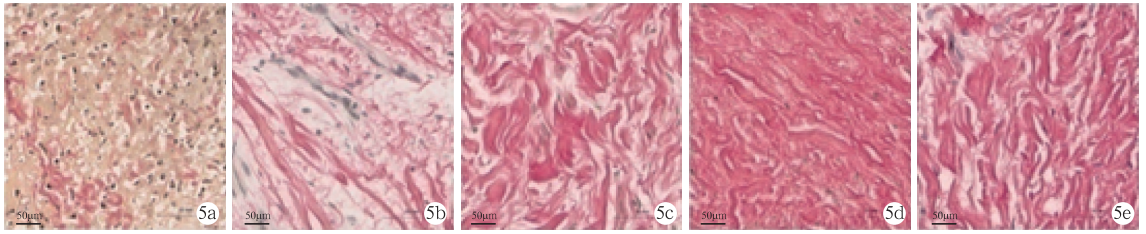
Fig. 4 The average epithelial thickness.



3a~3e 分别为 3、7、14、21 d 和对照组的兔硬腭黏膜组织学结构

图 3 各组兔硬腭角化黏膜组织学结构(苏木精-伊红染色, $\times 100$, 200 μm)

Fig. 3 Histological structure of keratinized mucosa in each group (HE staining, $\times 100$, 200 μm)



5a~5e 分别为 3、7、14、21 d 和对照组的兔硬腭黏膜组织学结构

图 5 各组兔硬腭角化黏膜组织学结构(VG 染色, ×400, 50 μm)

Fig. 5 Histological structure of keratinized mucosa in each group (VG staining, ×400, 50 μm)

2.4.3 上皮的平均厚度 3 d 组和 7 d 组无完整上皮结构,故上皮厚度记为 0。对照组、14d 和 21d 上皮平均厚度分别为(273.74 ± 38.75)、(191.80 ± 29.41)、(333.43 ± 32.48) μm。14d 组小于对照组和 21d 组($P < 0.05$)。21 d 组与对照组相比无统计学差异,见图 3、图 4。

2.4.4 胶原纤维密度的评分 3 d 组和 7 d 组都小于对照组($P < 0.05$)。21 d 组大于对照组($P < 0.05$)。14d 与对照组无统计学差异,见表 4、图 5。

表 4 胶原纤维密度的评分

Table 4 The grade of the collagen fibres density

组别	1分	2分	3分	4分	5分	P 值
对照组	0	0	0	3	0	—
3 d	3	0	0	0	0	0.025
7 d	1	2	0	0	0	0.034
14 d	0	0	1	2	0	0.317
21 d	0	0	0	0	3	0.025

3 讨论

3.1 实验动物的选择 国内外建立口腔角化软组织缺损模型的方法不尽相同。张亚军等^[5]在大鼠硬腭黏膜上制备 3 mm 软组织缺损。Rinastiti 等^[6]用 4 mm 标准皮肤环形切取器,切取兔颊侧牙龈黏膜。罗恩等^[7]在羊硬腭处制备 18 mm × 16 mm 的大块黏膜缺损。还有外国学者选用猴作为实验对象^[8]。

国内外相关动物模型的建立存在诸多问题。形成较大面积的角化软组织缺损,通常采用量尺划线加外科手术的方式直接切除^[7],这不符合模型建立原则中的造模工具标准化的原则^[9]。有些学者借助标注化造模工具来进行模型建立^[5,6],但却忽视了缺损的软组织量不足(<10 mm)、观察时间不足及各项指标不灵敏的问题。选择大型动物作为实验对象,资金消耗过大,饲养困难,管理不便。灵长类动物虽然与人类相似性好,但数量稀少且价格昂贵。

实验使用日本大耳白兔的硬腭主要有以下几点原因:1)经济实惠,易于管理;2)兔的牙龈组织量少,位置靠后,不便于观察和操作,而硬腭软组织量充

足,位于口腔中前部,术野清晰,易于操作;3)硬腭软组织组织学结构与人类口腔内角化软组织类似^[6,10]:上皮都被覆复层鳞状上皮,以正角化为主,上皮钉突明显,固有层由致密的纤维结缔组织构成。3.2 创伤愈合过程的分析 创伤愈合是一个多种炎症细胞和因子共同参与的动态变化过程。大致包含炎症期、细胞增值期、组织重建 3 个时期。建模 3d 黏膜炎症和红肿明显,炎症评分最高。这可能与创伤后中性粒细胞、单核细胞及淋巴细胞吞噬坏死组织有关。7d 开始血管内皮细胞和成纤维细胞迁移至创面,血小板衍生生长因子、转化生长因子和成纤维细胞合成胶原纤维^[11]。21 d 胶原纤维异常致密,可能与转换生长因子 β1 促进瘢痕愈合有关^[12]。本研究中,兔硬腭角化黏膜缺损从 7d 开始至 21d 出现再上皮化,这可能是生发层细胞不断增殖的结果^[10]。随着角化上皮和结缔组织的不断形成,组织发生改建,其过程中可能有瘢痕挛缩产生。

3.3 模型建立的评估及意义 动物模型建立需要符合相似性、重复性(标注化)、可靠性、易行性和经济性这 5 项原则^[9]。兔的硬腭黏膜与人类口腔角化软组织的组织学结构,实验术区与腭黏膜移植术的供区,实验观察指标与评价人类软组织缺损后的恢复指标均具有相似性。本实验通过大体观察、组织学观察、炎症等级和胶原纤维密度的评分以及上皮平均厚度的测定,证明了该动物模型的建立与人类软组织缺损后的愈合规律相似。根据模型建立的时间点设计的相似性原则结合创伤愈合的 3 个时期,将实验的时间点选择为 3、7、14 d 和 21 d,分别代表炎症早期、炎症晚期和细胞增殖早期、细胞增殖晚期和组织重建期。

理想的动物模型应具备可重复和标注化的特性^[9]。本实验首次采用 10 mm 的标准造模工具,既保证了缺损组织量的需求又保证了模型建立的标准一致性。避免了因手术刀片、量尺划线等操作所产生的误差。

实验所模拟的角化软组织缺损并非实验兔自发出现,实验兔也没有与该病症相混淆的疾病和症状,因此该模型的建立完全符合可靠性原则的要求。经过病历切片证实实验可以可靠地反映角化软组织缺损症状及病理过程。另外日本大耳白兔价格实惠、管理方便、易于实验,这完全符合易行性和经济性原则。

综上所述,本实验从形态学和组织学两方面入手,成功建立了口腔角化软组织缺损模型,并反过来通过对创面愈合率和上皮厚度的定量研究以及对炎症和胶原纤维密度的定性研究,验证了模型建立的可行性和可靠性。为后续研究促进口腔角化软组织修复的方法、材料和机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Chiu YW, Lee SY, Lin YC, et al. Significance of the width of keratinized mucosa on peri-implant health [J]. J Chin Med Assoc, 2015, 78(7): 389-394
- [2] 赵钰婷,孟维艳. 种植体表面对牙龈上皮组织生物学行为影响的研究进展[J]. 口腔医学研究, 2015, 31(9): 942-944
- [3] Zucchelli G, Mazzottil C, Mounssif I, et al. A novel surgical-prosthetic approach for soft tissue dehiscence coverage around single implant [J]. Clin Oral Implants Res, 2013, 24(9): 957-962
- [4] Eren G, Atilla G. Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a split-mouth randomized clinical

- trial [J]. Clin Oral Investig, 2014, 18(8): 1941-1948
- [5] 张亚军,杨聪翀,刘来奎,等. 低浓度尼古丁对大鼠硬腭软组织缺损愈合的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15): 2326-2331
- [6] Rinastiti M, Santoso AL, Sosroseno W. Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2006, 35(3): 247-251
- [7] 罗恩,胡静,李继华,等. 应用可吸收生物膜引导硬腭黏骨膜再生[J]. 中国临床康复, 2005, 9(42): 19-21
- [8] Warrer K, Buser D, Lang NP, et al. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys [J]. Clin Oral Implants Res, 1995, 6(3): 131-138
- [9] 刘民. 医学实验动物学[M]. 合肥:安徽大学出版社, 2012: 139-141
- [10] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 第6版. 北京:人民卫生出版社, 2012: 83-116
- [11] Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management [J]. Surg Clin North Am, 2017, 97(1): 189-207
- [12] Ding DX, Gang MA, Chen T. Expression and distribution of TGF- β 1 and MMP-2 in the epidermis of pathological scar [J]. Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-venere, 2013, 20(1): 22-25

[收稿日期:2017-11-09]

(本文编辑 李四群)

《口腔疾病防治》杂志征稿及征订启事

《口腔疾病防治》是由广东省口腔医院、广东省牙病防治指导中心主办,中南大学湘雅口腔医学院、郑州大学口腔医学院、南昌大学口腔医学院、重庆医科大学口腔医学院、福建医科大学口腔医学院等五所大学协办,月刊,CN44-1724/R,ISSN2096-1456。主要报道国内外口腔医学研究新进展和口腔疾病防治新成果、新技术、新经验,服务口腔疾病预防治疗领域学术交流和口腔疾病防控工作。

本刊图随文走、全铜版纸彩色印刷,设有专家论坛、专家述评、专栏论著、基础研究、临床研究、防治实践、病例报告、综述等栏目。其中含有省级以上基金优秀论文录用后可3个月内快速发表。

本刊官网及投稿网址为 <http://www.kqjbfz.com>,本刊不收取审稿费,本刊没有授权或委托任何其他网站受理作者投稿,谨防诈骗。欢迎广大读者订阅。全国各地邮局均可订阅,邮发代号46-225。每月20日出版,定价为每册5.00元,全年60元。

如错过邮局订阅时间,可直接向编辑部订购。请将款项汇入开户银行:广州市建行昌岗路支行,账号:44001430402050202779,户名:广东省口腔医院,并且将订阅者的邮政编码、详细地址、姓名、订阅年度、份数及汇款回执扫描件发送至本刊邮箱(kqjbfz@126.com)。编辑部电话:020-84403311,传真:020-84445386,Email:kqjbfz@126.com。