

年轻家兔髁突吸收动物模型的建立与研究

金雪梅¹ 安玮^{1,2} 郭莎¹ 阿拉发提·何亚斯丁¹ 加娜尔·吐根别克¹ 姚志涛^{1,2}

¹新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医学院)口腔颌面创伤正颌外科,乌鲁木齐 830054; ²新疆维吾尔自治区口腔医学研究所,乌鲁木齐 830054

通信作者:姚志涛,Email:yaozhitaodoctor@163.com

【摘要】 目的 探讨Ⅲ类杠杆生物力学原理对构建年轻家兔髁突吸收模型的影响。方法 以16只6月龄雌性家兔为研究对象,随机数字表法分为2周实验组、4周实验组、2周对照组及4周对照组,每组4只。2个实验组进行髁突吸收造模处理,2个对照组不做任何处理。髁突吸收造模方法:于家兔下颌前牙堆塑强度较高的树脂突,用此阻止上下颌牙在咀嚼运动时的正常咬合,使家兔被动做下颌后退动作咀嚼磨碎食物,使双侧颞下颌关节(TMJ)在Ⅲ类杠杆生物力的长期压迫作用下出现髁突吸收。2周实验组与2周对照组于建模2周时处死取材,4周实验组与4周对照组于建模4周时处死取材。通过对家兔TMJ部位CT三维重建观察并测量髁突表面积及体积变化,对髁突组织进行苏木精-伊红染色及外周血进行Elisa检测测量骨代谢水平。使用SPSS 19.0统计软件对各实验组与对照组数据进行独立样本 t 检验。**结果** (1)CT三维重建:2周实验组髁突体积[(196±8) mm³]、表面积[(280±12) mm²]较对照组体积[(204±9) mm³]和表面积[(292±13) mm²]有所减小,差异有统计学意义($t_{\text{体积}}=4.409, P_{\text{体积}}=0.022; t_{\text{表面积}}=3.660, P_{\text{表面积}}=0.035$)。4周实验组髁突体积[(192±18) mm³]、表面积[(280±10) mm²]较对照组体积[(211±11) mm³]、表面积[(309±10) mm²]减小,差异有统计学意义($t_{\text{体积}}=4.081, P_{\text{体积}}=0.027; t_{\text{表面积}}=3.738, P_{\text{表面积}}=0.033$)。同一建模周期,左右侧髁突表面积与体积变化程度未见明显差异。(2)苏木精-伊红染色:2周实验组髁突增殖层细胞增多,细胞簇状聚集,出现均质样无细胞区域。4周实验组髁突软骨分层不明显,肥大层细胞及核明显增大,骨小梁间隙中充满大量的红细胞。(3)关节盘肉眼观:2周实验组及4周实验组关节盘中间带较对照组透光程度增加。(4)骨代谢指标:血清骨钙素浓度2周实验组[(35.8±1.4) ng/mL]较2周对照组[(18.1±8.1) ng/mL]增高,差异有统计学意义($t=7.814, P=0.004$);4周实验组[(37.6±1.7) ng/mL]较4周对照组[(19.3±6.4) ng/mL]亦增高,差异有统计学意义($t=4.752, P=0.018$);25羟维生素D浓度2周实验组[(126.5±16.8) nmol/mL]较2周对照组[(176.0±8.9) nmol/mL]降低,差异有统计学意义($t=5.937, P=0.010$);4周实验组与4周对照组差异不明显。4周实验组较2周实验组对比,25羟维生素D浓度增高,血清骨钙素浓度无明显差异。**结论** 本研究所建立的年轻家兔髁突吸收模型能较好地模拟力学作用下髁突吸收疾病的组织病理学变化且具有结果稳定、可重复性好的优点,为后期实验研究及临床研究提供可参照性。

【关键词】 年轻家兔; 髁突吸收; 下颌后缩; Ⅲ类生物杠杆力; 动物模型

基金项目:新疆维吾尔自治区“天山英才”培养计划(2023TSYCCX0055);新疆维吾尔自治区研究生创新项目(XJ2024G177)

引用著录格式:金雪梅,安玮,郭莎,等.年轻家兔髁突吸收动物模型的建立与研究[JOL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2025,19(1):16-24.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.01.003

Establishment and research of an animal model for condylar resorption in young domestic rabbits

Jin Xuemei¹, An Wei^{1,2}, Guo Sha¹, Alahati He Yasding¹, Ganar Turgenbuk¹, Yao Zhitao^{1,2}

¹Department of Oral and Maxillofacial Trauma and Orthog Nathic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated School of Stomatology), Urumqi 830054, China; ²Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Stomatology, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Yao Zhitao, Email:yaozhitaodoctor@163.com

[Abstract] Objective Exploring the effect of class III lever biomechanical principles on the construction of a condylar resorption model in young rabbits. **Methods** A total of sixteen 6-month-old female rabbits were randomizedly divided into four groups, i.e., 2-week experimental group, 4-week experimental group, 2-week control group, and 4-week control group, with 4 rabbits in each group. The experimental groups were treated with condylar resorption modeling, and the control groups were left untreated. The condylar resorption modeling method was as follows. The mandibular anterior teeth of rabbits were stacked with high-strength resin protrusions, which prevented the normal occlusion of the maxillary and mandibular teeth during mastication, so that the rabbits could passively perform mandibular backward movements to chew and grind food, and condylar resorption of bilateral temporomandibular joints occurred under the long-term pressure of the class III lever biological force. The 2-week experimental group and the 2-week control group were necropsied after 2 weeks of modeling, whereas the 4-week experimental group and the 4-week control group were necropsied after 4 weeks of modeling. Bone metabolism was measured by CT scanning and 3D reconstruction of the temporomandibular joints of rabbits. Specifically, condylar surface area and volume changes, hematoxylin-eosin staining of condylar tissues, and Elisa assay of peripheral blood were evaluated. Independent samples *t*-test was used for statistical analysis of the data with software (SPSS 19.0). **Results** (1) CT 3D reconstruction: The volume of the condyle [(196 ± 8) mm³] and the surface area [(280 ± 12) mm²] in the 2-week experimental group significantly decreased compared to those of the control group [(204 ± 9) mm³, (292 ± 13) mm²; *t*_{volume} = 4.409, *P*_{volume} = 0.022; *t*_{surface area} = 3.660, *P*_{surface area} = 0.035]. The volume of the condyle [(192 ± 18) mm³] and the surface area [(280 ± 10) mm²] in the 4-week experimental group significantly decreased compared to those of the control group [(211 ± 11) mm³, (309 ± 10) mm²; *t*_{volume} = 4.081, *P*_{volume} = 0.027; *t*_{surface area} = 3.738, *P*_{surface area} = 0.033]. There was no significant difference in the degree of change in the surface area and volume of the right and left lateral condyles during the same modeling cycle. (2) Hematoxylin-eosin stain: In the 2-week experimental group, increase in the number of cells was observed in the proliferative layer of the condyle, with clustered aggregation of cells and the appearance of homogeneous cell-free areas. In the 4-week experimental group, there was no obvious stratification of the condylar cartilage, and the hypertrophic layer of cells and nuclei were markedly enlarged, with the interstitial space of the trabeculae filled with a large number of erythrocytes. (3) Articular disc in the naked-eye view: The degree of light transmission increased in the middle band of the articular disc in the 2-week experimental group and the 4-week experimental group compared to the control group. (4) Bone metabolism index: Serum osteocalcin concentration: The 2-week experimental group [(35.8 ± 1.4) ng/mL] was higher than the 2-week control group [(18.1 ± 8.1) ng/mL], and the difference was statistically significant (*t* = 7.814, *P* = 0.004); The 4-week experimental group [(37.6 ± 1.7) ng/mL] also showed an increase compared with the 4-week control group [(19.3 ± 6.4) ng/mL], and the difference was statistically significant (*t* = 4.752, *P* = 0.018). The 25 hydroxyvitamin D concentration: The 2-week experimental group [(126.5 ± 16.8) nmol/mL] decreased compared with the 2-week control group [(176.0 ± 8.9) nmol/mL], and the difference was statistically significant (*t* = 5.937, *P* = 0.010). There was no significant difference between the 4-week experimental group and the 4-week control group. Compared with the 2-week experimental group, the 4-week experimental group showed an increase in the concentration of 25 hydroxyvitamin D, while the serum osteocalcin concentration did not change significantly. **Conclusions** The young rabbit condylar resorption model established in this study could better simulate the histopathological changes of condylar resorption disease under mechanical effects and had the advantages of stable and reproducible results, which could provide references for the later experimental and clinical studies.

[Key words] Young rabbit; Condylar resorption; Mandibular recession; Class III biological leverage force; Animal model

Fund programs: "Tianshan Talents" Training Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023TSYCCX0055); Graduate Innovation Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJ2024G177)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.01.003

颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)在咀嚼、呼吸和言语功能中起着至关重要的作用。髁突作为TMJ的一部分,通常被认为是下颌骨生长发育的中心。当TMJ受到各种内在或外部环境因素的影响时,容易发生颞下颌关节紊乱(temporomandibular disorders, TMD)、髁突病理性变,甚至严重的髁突吸收(condylar resorption, CR)^[1]。CR是一种以髁突软骨部分出现吸收为表现的疾病,可发生于单侧或双侧TMJ^[1-2]。目前,对于CR的确切病因及发病机制尚未完全明确,自身免疫疾病、咬合异常、内分泌紊乱、营养障碍、代谢性疾病、感染和精神压力过大等可能作为CR诱因,参与影响髁突纤维软骨代谢和关节功能性改建,进而导致CR^[1,3]。de Bont和Stegenga^[4]根据存在的发病诱因将CR分为继发性CR和原发性CR。继发性CR的原因包括局部或全身性因素的影响,例如:TMJ结构功能紊乱、咬合紊乱和外伤等^[5]。原发性CR即特发性CR(idiopathic condylar resorption, ICR),是发生于髁突软骨组织特异性变化,由于它主要影响对象为青春期女性,因此被Wolford等^[6]称为“啦啦队长综合征”。CR发病隐匿且进展迅速,通常在6~12个月内引起整个髁突的吸收^[1],使患者出现渐进性张口受限、前牙开骀等症状,严重影响患者的生存质量。据报道,有28%的年轻患者(15~30岁)髁突结构或功能发生变化,女性发病率明显高于男性^[7]。患者就诊时主诉通常为前牙逐渐开骀,伴有或不伴有张口疼痛及张口受限。目前,对于此疾病的临床病因及治疗,尚无统一标准^[8]。本研究旨在通过无创操作使年轻家兔下颌后缩的方法来建立CR动物模型,并在此基础上观察力学因素下CR在不同病程阶段的组织病理学特性,为TMJ中CR的细胞生物学机制及临床研究提供理想的载体。

材料与方法

一、实验动物分组方法

选取购自新疆医科大学动物实验中心的6月龄雌性家兔16只[体质量1 800~2 100 g,合格证号:SCXK(新)2023-0001]。其中12只通过随机数字表法分为2周实验组(4只)、4周实验组(4只)、2周对照组(2只)及4周对照组(2只)。所有家兔分笼饲养(每笼1只)于温度22~24℃、相对湿度55%~60%、12 h光照/12 h黑暗的昼夜交替环境下,每日给予充足的饲料及饮用水。在适应性饲养2 d后,对

2个实验组进行CR造模处理,2个对照组不做任何处理。分别在实验开始2周、4周后,将2周实验组、2周对照组和4周实验组、4周对照组家兔处死取材。在2周及4周处死取材时各购买2只同龄体质量相近家兔对2周对照组和4周对照组进行补充,使2周对照组和4周对照组家兔数量亦达到每组4只。本研究通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批(审批号:IACUC-20220442-18)。

二、下颌后缩模型的建立方法

在2周实验组和4周实验组家兔下颌前牙分别堆塑强度较高的树脂突,用此树脂突阻止上下颌牙在咀嚼运动时的正常咬合,进而使家兔被动做下颌后退动作以咀嚼磨碎食物。成年兔通常有28颗牙齿,包括6颗门齿、10颗前白齿及12颗后白齿。其中上颌有两套门齿,前后各1对,后1对较前1对小,形成特殊的“双门齿型”,下颌有1对门牙,左右成对生长。从颊侧观下颌前牙呈长方形,正常咬合时下颌前牙正对上颌门牙处(图1A)。家兔的牙齿是终身生长的,需要通过咀嚼运动不断磨耗以保持适当的长度^[9]。

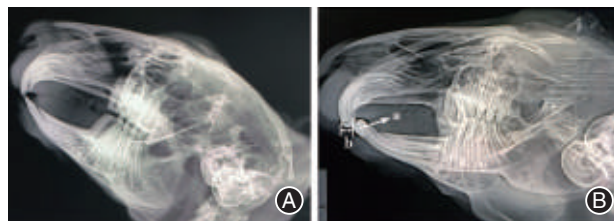


图1 实验组家兔下颌前牙粘接树脂突前后头颅X线图像 A:正常家兔头颅投影侧面观;B:粘接下颌树脂突后家兔头颅投影侧面观, a为下颌前牙处粘接的树脂突, b为树脂突使下颌产生向后2.5 mm的后缩位移。

本研究中家兔下颌前牙树脂突的制作方法(图2):使用注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋(舒泰®50)与盐酸塞拉嗪注射液(速眠新Ⅱ注射液)1:1配比,肌肉注射麻醉家兔(0.1 mL/kg)。全身麻醉生效后牵拉下颌使口张开以保证视野良好,用干棉球擦拭下颌前牙处唾液,用无油气体干燥。于下颌前牙唇侧及近远中面涂布酸蚀剂酸蚀60 s,用湿棉球擦净酸蚀剂后吹干,待牙面呈白垩色后用小棉棒涂布粘接剂,光固化灯距离牙面1 mm处照射20 s。用充填器取适量树脂堆塑于下颌前牙唇侧、近远中面及切缘处,保证厚度不大于2 mm。适当塑形后光固化灯照射20 s,继续堆置直到使下颌产生向后2.5 mm的后缩位移,并且使此树脂突与下颌平面呈25°~30°角以增强固位(图1B)。实验期间每天查看树脂

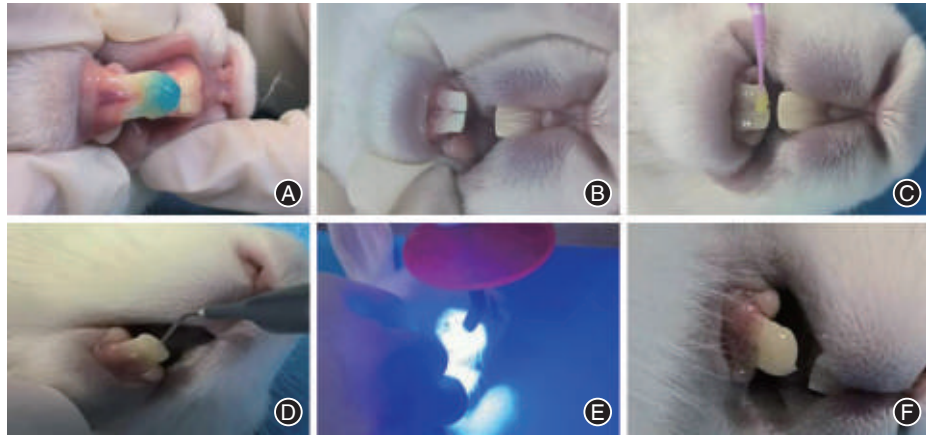


图2 实验组家兔经下颌前牙树脂突粘接建立下颌后缩模型的操作过程 A:下颌前牙唇侧及近远中面涂布酸蚀剂,酸蚀60 s;B:吹干牙面至白垩色;C:涂布粘接剂;D:堆塑树脂;E:光固灯照射20 s;F:堆塑树脂固化完成后。

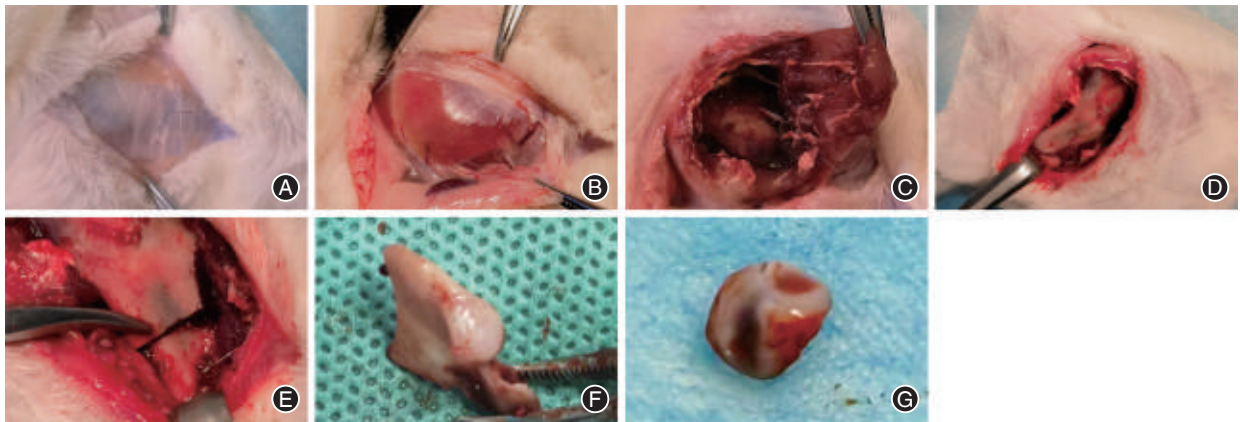


图3 各组家兔髁突及关节盘组织取材的方法及过程 A:于颊部作垂直切口;B:暴露咬肌;C:整体翻起咬肌;D:整体翻起咬肌以暴露下颌升支后缘;E:自髁突下10 mm处离断下颌升支;F:完整取出髁突;G:完整取出关节盘。

突粘接情况,一旦发现有损坏和脱落情况,及时修理和安装,从而不至于影响下颌持续性后缩的效果。所有实验组动物均相同处理。

三、取材方法及过程

所有实验动物通过耳缘静脉注射空气的方法处死。取材过程见图3:家兔颊部备皮后用手术刀做垂直切口,暴露咬肌后自咬肌下缘剥离咬肌至骨面,自咬肌下缘向后至下颌升支后缘,整体翻起咬肌以暴露下颌升支后缘,继续向上剥离直至见喙突及乙状切迹处。用咬骨钳自颧弓根部处夹断颧弓,用弯钳夹出断离的颧弓根部可见髁突及关节盘。用电动骨刀自髁突下10 mm处离断下颌升支,完整取出髁突及关节盘。对侧取材方法相同。

四、头颅及髁突三维CT扫描重建

对所有实验动物在处死取材前以相同角度进行头颅部三维CT[Brilliance iCT,飞利浦(中国)投资有限公司]扫描及重建。截取重建后髁突部分观察并测量其表面积及体积(图4)。

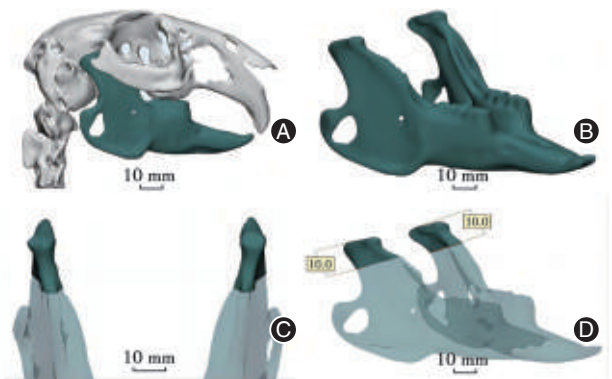


图4 各组家兔处死取材前头颅CT三维重建图像 A:家兔头部三维重建;B:下颌骨成像;C:截取双侧髁突;D:取髁突上缘垂直距离10 mm测量表面积及体积。

五、髁突组织病理组织学研究

造模实验设计对应周数取双侧髁突,采用4%多聚甲醛溶液室温下固定24 h,12.5% EDTA脱钙液中脱钙5周,直至可以使用大头针轻松穿透组织为止。常规脱水、透明、浸蜡和包埋。采用冰冻切片(HM525NX, Thermo Fisher Scientific, 美国)及自

带刀片(MX35),以Kawamoto薄膜法对双侧髁突进行硬组织矢状面5 μm 连续切片。选择中央矢状切面进行苏木精-伊红染色。

六、外周血中骨代谢水平相关研究

在对应周数家兔处死前,于耳缘静脉取外周血2 mL,以3 000 r/min离心10 min(离心半径20 cm),分离上层血清,采用Elisa法以酶标仪检测各组家兔血清中25羟维生素D和血清骨钙素的含量,严格按照相应试剂盒说明书操作。

七、统计学处理方法

使用SPSS 19.0软件对实验数据进行统计分析。首先对本研究各组定量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验行正态性检验,所得数据均符合正态分布,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2周实验组与2周对照组、4周实验组与4周对照组间的髁突体积、髁突表面积、25羟维生素D和血清骨钙素浓度的比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、CT影像的测量分析

CT三维重建扫描结果显示,对照组髁突表面软骨光滑连续且完整(图5A、5C)。2周实验组髁突表面可见部分区域轻微凹陷,呈凹凸不平状,以髁突前表面为主(图5B)。4周实验组较2周实验组表面连续性有所改善,但整体形状仍与对照组有差异(图5D)。

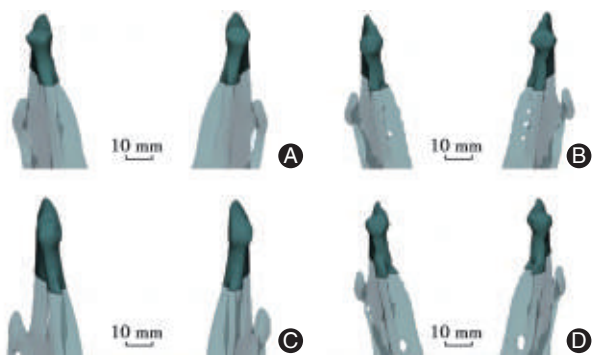


图5 各组家兔头颅三维CT中髁突三维重建图像 A:2周对照组髁突;B:2周实验组髁突,前斜面可见轻微扁平凹陷;C:4周对照组髁突;D:4周实验组髁突,前斜面连续性改善,整体形状仍异常。

统计学分析可见,双侧髁突表面积与体积随建模周期的增加呈现减少趋势。2周实验组髁突体积为 $(196 \pm 8) \text{ mm}^3$,较2周对照组髁突体积 $[(204 \pm 9) \text{ mm}^3]$ 有所减小,差异有统计学意义($t = 4.409, P = 0.022$);2周实验组髁突表面积 $[(280 \pm 12) \text{ mm}^2]$ 也较2周对

照组 $[(292 \pm 13) \text{ mm}^2]$ 减小,差异也有统计学意义($t = 3.660, P = 0.035$)。4周实验组髁突体积为 $(192 \pm 18) \text{ mm}^3$,较4周对照组髁突体积 $[(211 \pm 11) \text{ mm}^3]$ 减小,差异有统计学意义($t = 4.081, P = 0.027$);4周实验组髁突表面积 $[(280 \pm 10) \text{ mm}^2]$ 比4周对照组 $[(309 \pm 10) \text{ mm}^2]$ 亦减小,差异有统计学意义($t = 3.738, P = 0.033$,表1)。同一建模周期,左右侧髁突表面积与体积变化程度未见明显差异(表2)。

表1 各组家兔髁突吸收建模后CT三维重建中髁突表面积及体积分析($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	髁突表面积(mm^2)		髁突体积(mm^3)	
		2周	4周	2周	4周
对照组	4	292 \pm 13	309 \pm 10	204 \pm 9	211 \pm 11
实验组	4	280 \pm 12	280 \pm 10	196 \pm 8	192 \pm 18
t 值		3.660	3.738	4.409	4.081
P 值		0.035 ^a	0.033 ^a	0.022 ^a	0.027 ^a

注:组间相比差异有统计学意义($^a P < 0.05$)。

表2 实验组家兔髁突吸收建模后CT三维重建中左右侧髁突表面积及体积比较($\bar{x} \pm s$)

部位	例数	髁突表面积(mm^2)		髁突体积(mm^3)	
		2周	4周	2周	4周
左侧	4	279 \pm 19	280 \pm 14	197 \pm 11	192 \pm 24
右侧	4	280 \pm 8	280 \pm 7	197 \pm 11	192 \pm 13
t 值		0.119	0.101	0.362	0.071
P 值		0.913	0.926	0.741	0.362

二、髁突组织苏木精-伊红染色

TMJ组成部分主要包括髁突、关节盘、关节囊、关节韧带及关节窝。苏木精-伊红染色中通常可观察到关节盘、髁突等(图6)。

1. 对照组:2周及4周对照组中家兔髁突软骨各细胞层分层明显且排列整齐。实验组家兔TMJ髁突软骨病损主要表现为软骨组织的退行性病变,且具有明显的时间进展性(图7)。

2. 2周实验组:各层细胞排列紊乱,界限模糊。髁突增殖层细胞数量增多,细胞簇状聚集,该层可见大量细胞核固缩,胞核外形不规则,出现均质样无细胞区域。骨小梁的形态较对照组变细,但并不明显(图7)。

3. 4周实验组:可见髁突软骨各层细胞分层仍不明显,肥大层细胞数量增多,细胞体积明显增大,部分细胞处于增殖分裂期。此时无细胞均质区减小消失。软骨下骨内骨小梁间隙中充满大量的红细胞,包括在钙化软骨层,较对照组有较多的红细

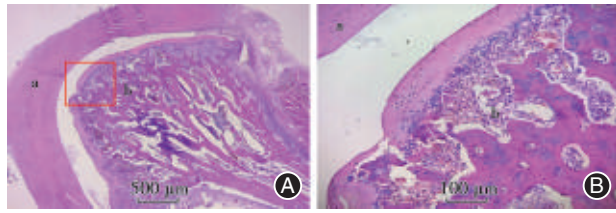


图6 家兔颞下颌关节(TMJ)结构镜下观察(苏木精-伊红) A:TMJ结构;B:放大视野下图A□区域结构;a为关节盘,b为髁突。

胞浸润,髁突软骨下骨骨小梁明显变细,单位面积内骨小梁的面积减少明显,可见散在的骨小梁碎片,甚至出现骨小梁中断和微骨折的现象,小梁间隙间有大量慢性炎症细胞浸润(图7)。

三、关节盘肉眼观

关节盘肉眼观,与2周、4周对照组相比2周实验组及4周实验组中间带透光程度增加,课题组预测建模过程中或有关节盘中间带厚度变化可能性,2周实验组及4周实验组肉眼观察透光程度差异不明显(图8)。

四、外周血中骨代谢水平

1. 血清骨钙素:与2周对照组外周血血清骨钙素浓度 $[(18.1 \pm 8.1) \text{ ng/mL}]$ 相比,2周实验组 $[(35.8 \pm$

$1.4) \text{ ng/mL}]$ 明显升高,差异有统计学意义($t=7.814, P=0.004$)。4周实验组 $[(37.6 \pm 1.7) \text{ ng/mL}]$ 较4周对照组 $[(19.3 \pm 6.4) \text{ ng/mL}]$ 血清骨钙素浓度亦增高,差异有统计学意义($t=4.752, P=0.018$,表3)。2周实验组与4周实验组相比,血清骨钙素浓度差异无统计学意义($t=1.340, P=0.271$)。

2. 25 羟维生素 D:与2周对照组 $[(176.0 \pm 8.9) \text{ nmol/mL}]$ 相比,2周实验组外周血清中25羟维生素D浓度 $[(126.5 \pm 16.8) \text{ nmol/mL}]$ 降低,差异有统计学意义($t=5.937, P=0.010$);4周对照组 $[(182.4 \pm 5.9) \text{ nmol/mL}]$ 与4周实验组 $[(177.7 \pm 2.1) \text{ nmol/mL}]$ 外周血清中25羟维生素D浓度相差不大,差异无统计学意义($t=1.453, P=0.242$,表3)。4周实验组与2周实验组相比,外周血清中25羟维生素D浓度升高,差异有统计学意义($t=5.743, P=0.010$)。

讨 论

一、实验动物的选择

TMJ疾病的研究一直以来都需要动物模型参与。既往TMJ疾病动物实验研究中,学者们常用大鼠、荷兰猪、兔、山羊、小型猪、犬和猴等作为实验对

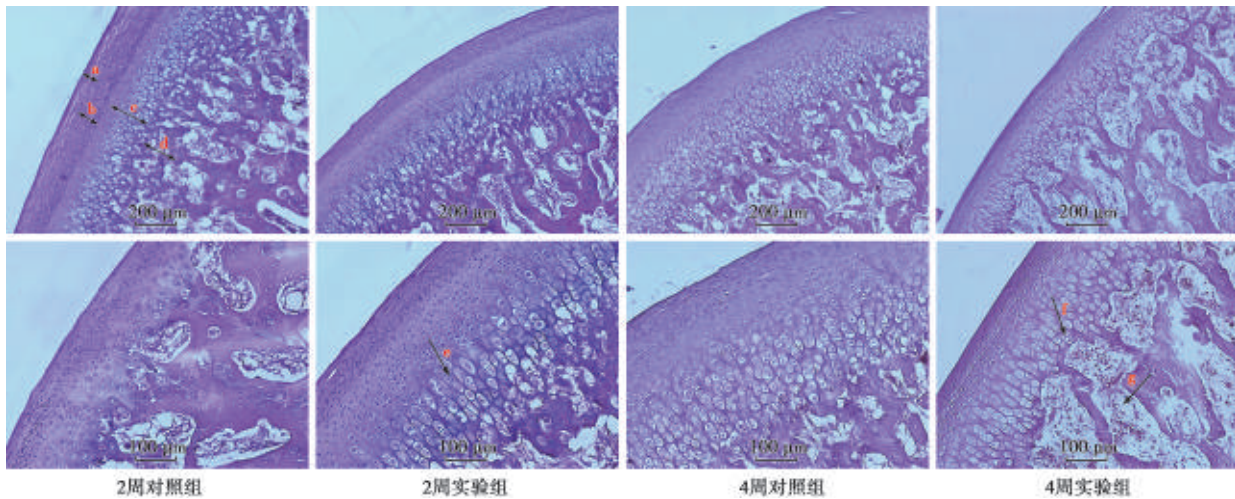


图7 各实验组及对照组家兔髁突组织镜下观察(苏木精-伊红) a为关节表面带,b为增殖层,c为肥大层,d为钙化软骨层,e示胞核外形不规则,出现均质样无细胞区域,f示肥大层细胞体积明显增大,部分细胞处于增殖分裂期,g示骨小梁间隙中充满大量的红细胞。

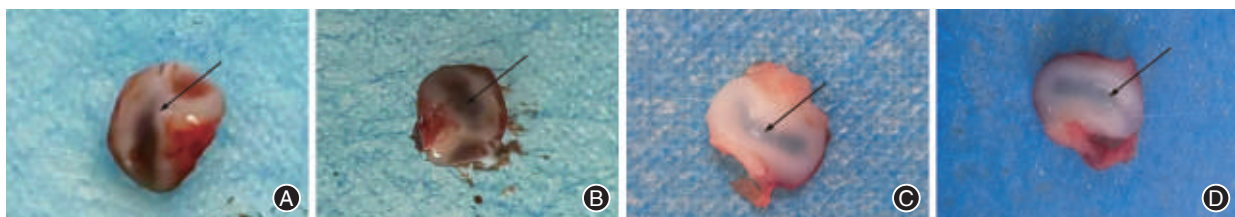


图8 各实验组及对照组家兔关节盘组织肉眼观对比 A:2周对照组;B:4周对照组;C:2周实验组;D:4周实验组;箭头所示为关节盘中间带。

表3 各组家兔髁突吸收建模后外周血清骨代谢指标分析($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	血清骨钙素(ng/mL)		25羟维生素D(nmol/mL)	
		2周	4周	2周	4周
对照组	4	18.1±8.1	19.3±6.4	176.0±8.9	182.4±5.9
实验组	4	35.8±1.4	37.6±1.7	126.5±16.8	177.7±2.1
<i>t</i> 值		7.814	4.752	5.937	1.453
<i>P</i> 值		0.004*	0.018*	0.010*	0.242

注:组间相比差异有统计学意义(* $P < 0.05$)。

象^[10-14]。Zou等^[12]通过研究发现大鼠TMJ髁突和关节盘损伤的病理变化与人类较为相似,所以目前大部分CR动物模型以大鼠为载体。本课题组前期曾采用大鼠进行预实验,或因CT参数差异及视野选择等因素,结果显示家兔CT成像较大鼠CT成像清晰度更高,故选用6月龄雌性家兔,进一步研究年轻家兔为载体的动物模型是否与既往大鼠研究结果具有一致性,且该年龄阶段的家兔与既往研究中CR好发于青春期女性这一特点相吻合。

二、动物模型建立的原理

目前动物TMJ的CR造模方法主要包括开放性外科手术、卵巢早衰诱导、基因敲除和咬合干扰等^[15-17],尚无明确“金标准”,上述这些方法各有其优缺点。本实验以咬合干扰为着手点,利用Ⅲ类生物力学原理使前牙区、髁突及咀嚼肌成一杠杆系统,其中以前牙切咬的食物为重点,TMJ为支点,升颌肌群以咬肌和颞肌为主要动力点,形成第Ⅲ类杠杆,阻力臂长于动力臂,属费力杠杆,机械效能较低。当加高前牙咬合时,支点受力增加,即髁突受力增加,当长期过度的力加于髁突时,超过自身负荷,则出现CR。该实验方法操作简单且无创,较既往开放手术造模方法动物存活率明显提高。有实验发现,在大鼠下颌前导作用下,可以导致SD大鼠的TMJ组织发生改建,主要表现为髁突组织的生长速度加快,下颌骨发生继发性生长^[18]。由此引申出本课题论点,即年轻家兔下颌后退作用下,是否会导致TMJ组织发生髁突组织吸收性改建。

三、动物模型建立后髁突的影像学变化

本实验中观察到了年轻家兔模型的髁突外观及其关节软骨组织随着时间的进展所发生的一系列变化。肉眼观,建模初期可见家兔在下颌树脂突脱落情况下下颌前牙相对于上颌骨,较对照组明显后缩。这一明显退缩是否是由下颌树脂突阻挡作用下TMJ发生改建,或是此树脂突阻挡作用使上下颌牙在相当于正畸力下上颌前牙前突,下颌前牙后

缩进而出现上下颌前牙颊舌向距离逐渐增大,还有待进一步探究。髁突CT三维重建扫描结果中2周实验组髁突表面可见以髁突前表面为主的部分区域轻微凹陷,呈凹凸不平状。4周实验组较2周实验组表面连续性有所改善,说明时间因素对CR有一定的影响,2周时髁突对杠杆力产生明显应答,4周时髁突软骨层各类细胞对杠杆力出现适应性改建可能^[19]。随着建模周数增加,双侧髁突表面积与体积随建模周期的增加呈现减少趋势,直观地体现出此动物模型建立的有效性。

四、动物模型建立后髁突的组织学变化

苏木精-伊红染色法是组织学技术的常规染色方法之一。苏木精在碱性溶液中呈蓝色,容易将呈酸性的细胞核染成蓝色;伊红是一种化学合成的酸性染料,与蛋白质的氨基酸电荷结合使细胞浆染色,细胞浆、红细胞、肌肉和结缔组织等容易被伊红染成不同程度的红色或粉红色,与蓝色的细胞核形成鲜明的对比^[20]。光镜下正常家兔TMJ髁突软骨各细胞层排列整齐,分层明显:(1)纤维层:髁突表面平行排列的胶原纤维均匀致密,其间有少量梭形纤维细胞;(2)增殖层:细胞小、排列相对紧凑、呈梭形;(3)肥大层:由卵圆形软骨细胞及均匀的细胞间质组成;(4)钙化软骨层:可见发生骨化的软骨细胞。各细胞层分层明显,排列整齐^[21]。软骨层通过钙化软骨层与其下方的软骨下骨紧密连接,软骨下骨包括骨皮质、骨小梁和小梁间隙,以及穿行于其间的血管和神经。骨小梁排列方向为与髁突表面垂直^[22]。2周实验组各层细胞排列紊乱,界限模糊。髁突增殖层细胞增多,细胞簇状聚集,该层大量细胞核固缩,胞核外形不规则,出现均质样无细胞区域。骨小梁的形态较对照组变细,但并不明显。4周实验组可见髁突软骨各层细胞排列较2周实验组整齐,但分层仍不明显。各层细胞数量均增多,以肥大层最为显著,该层细胞核明显增大,部分细胞处于增殖分裂期。此时无细胞均质区减小消失。髁突软骨下骨骨小梁明显变细,单位面积内骨小梁的面积减少明显,可见散在的骨小梁碎片,甚至出现骨小梁中断和微骨折的现象。小梁间隙间有大量慢性炎症细胞浸润,但此期软骨下出血不如2周时明显。由此可见,家兔TMJ髁突软骨病损主要表现为软骨组织的退行性病变,且具有明显的时间进展性。

五、动物模型的建立对关节盘的影响

关节盘是TMJ结构中另一重要组成部分,正常

解剖结构中关节盘中间带薄,前、后部厚。在家兔张口及咀嚼运动中,关节盘与髁突一起在关节窝内向前下滑动,同时髁突又相对于关节窝转动。本研究主要研究目标为髁突,但在实验过程中,取材后肉眼观发现关节盘中间带随着建模时间的增加其透光程度有明显增加的现象,这为后续研究提供新启发,课题组预测随着建模时间的增加,关节盘中间带或有变薄可能性,本课题组在后期研究中也会将关节盘进一步纳入研究范围之内。

六、动物模型建立后骨代谢水平的变化

骨代谢是一种多因素参与的复杂过程,研究表明血清骨钙素是一种非胶原蛋白,能反映成骨细胞的分化与成熟,促进骨组织中羟基磷灰石(HA)沉积,可聚集成骨细胞,形成骨钙化^[23]。通过血清骨钙素可以了解成骨细胞特别是新形成成骨细胞的活动状态^[23-24]。骨钙素值随年龄的变化和骨更新率的变化而不同^[24]。此研究中与对照组相比较,2周实验组及4周实验组外周血清中骨钙素浓度明显升高,与既往研究结果一致,说明在杠杆力的作用下髁突组织新形成成骨细胞的状态较活跃,骨更新率应杠杆力的刺激而升高。维生素D是骨代谢的核心调控因子,维生素D的代谢产物 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在骨代谢的调节中起着关键的作用^[25-26]。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 通过降低肾脏中钙和磷的流失,同时刺激他们在肠道的吸收,从而调节体内骨外的钙稳态,以确保足够的骨基质矿化^[27]。本实验中与对照组相比,2周实验组血清中25羟维生素D浓度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),4周实验组血清中25羟维生素D浓度与对照组浓度相差小,差异无统计学意义($P > 0.05$)。国内外研究提示,正常青少年在生长发育过程中维生素D水平偏低情况普遍存在^[28-29],其中发生CR此类TMD患者血清中维生素D结果较正常青少年更严重^[30-31]。本实验结果显示CR与维生素D之间有密切关联,这提示研究者未来可以对CR与维生素D及其受体的相关性研究进行更深一步探讨。

本实验基于Ⅲ类生物力学原理,以诱导咬合作为介入手段建立年轻家兔CR的动物模型,初步通过CT三维重建、组织学切片及外周血相关骨代谢指标验证年轻家兔CR动物模型建立的可行性,以期为后续研究CR类疾病提供简单可行稳定的动物模型,为其后续研究工作提供理论依据。但本次实验样本量较小,试验周期较短,暂未进一步阐明相关

机制。在后续研究中,本课题组将进一步加大样本量,同时加入激素、环境及基因等其他因素与杠杆力的联合作用,进一步探索CR发生、发展的机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 金雪梅:实验设计与操作、资料收集、统计分析及论文撰写;安玮:协助实验设计、资料收集和论文审校;郭莎:协助资料收集和实验操作;阿拉发提·何亚斯丁、加娜尔·吐根别克:协助统计分析及作图;姚志涛:研究指导、论文审阅、经费支持

致谢 感谢本次实验及论文写作过程中病理科崔文丽主任在组织切片制作及观察方面的指导、检验科赵辉主任对骨代谢水平检测的指导、研究生朱泽博和于婧雯在实验操作过程中的帮助

参 考 文 献

- [1] Mercuri LG, Handelman CS. Idiopathic condylar resorption: What should we do? [J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2020, 32(1): 105-116. DOI: 10.1016/j.coms.2019.09.001.
- [2] Exposto CR, Peter S, Kristensen KD, et al. Condylar changes in patients with idiopathic condylar resorption: Retrospective 2-year follow-up CBCT-based case-control study [J]. Eur J Orthod, 2020, 42(6): 619-625. DOI: 10.1093/ejo/cjz099.
- [3] 陈欣慰,张善勇,杨驰. 青少年颞下颌关节髁突特发性吸收[J]. 中国实用口腔科杂志, 2017, 10(6): 326-329+334. DOI: 10.19538/j.kq.2017.06.002.
- [4] de Bont LGM, Stegenga B. Pathology of temporomandibular joint internal derangement and osteoarthritis [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 1993, 22(2): 71-74. DOI: 10.1016/S0901-5027(05)80805-7.
- [5] Chouinard AF, Kaban LB, Peacock ZS. Acquired abnormalities of the temporomandibular joint [J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2018, 30(1): 83-96. DOI: 10.1016/j.coms.2017.08.005.
- [6] Wolford LM, Cardenas L. Idiopathic condylar resorption: Diagnosis, treatment protocol, and outcomes [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2000, 116(6): 667-677. DOI: 10.1016/S0889-5406(99)70203-9.
- [7] Wang XD, Zhang JN, Gan YH, et al. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis [J]. J Dent Res, 2015, 94(5): 666-673. DOI: 10.1177/0022034515574770.
- [8] Ji YD, Resnick CM, Peacock ZS. Idiopathic condylar resorption: A systematic review of etiology and management [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2020, 130(6): 632-639. DOI: 10.1016/j.oooo.2020.07.008.
- [9] 秦川,谭毅. 医学实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015:67-68.
- [10] Vapniarsky N, Aryaei A, Arzi B, et al. The Yucatan minipig TMJ disc structure-function relationships support its suitability for human comparative studies [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2017, 23(11): 700-709. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0149.
- [11] Tong CK, Tideman H. The microanatomy of the rhesus monkey temporomandibular joint [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2001, 59

- (1):46-52. DOI:10.1053/joms.2001.19284.
- [12] Zou Y, Cai S, Lin H, et al. Experimental functional shift - induced osteoarthritis - like changes at the TMJ and altered integrin expression in a rat model[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1511(1):210-227. DOI:10.1111/nyas.14741.
- [13] Lin AW, Vapniarsky N, Cissell DD, et al. The temporomandibular joint of the domestic dog (*canis lupus familiaris*) in health and disease[J]. *J Comp Pathol*, 2018, 161: 55-67. DOI: 10.1016/j.jcpa.2018.05.001.
- [14] Monteiro JLGC, Takusagawa T, Vasconcelos BCE, et al. A rabbit model to investigate temporomandibular joint osteochondral regeneration[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2022, 134(1):20-27. DOI:10.1016/j.oooo.2021.12.004.
- [15] 焦子先. 兔髁突吸收动物模型的构建及山奈素对破骨细胞抑制作用的实验研究[D]. 上海:上海交通大学, 2018. DOI: 10.27307/d.cnki.gsjtu.2018.004723.
- [16] 田一弘. 功能矫形力过载致大鼠髁突软骨下骨吸收的成骨-破骨对话机制研究[D]. 青岛:青岛大学, 2020. DOI:10.27262/d.cnki.gqda.2020.000718.
- [17] Ying B, Chen K, Hu J, et al. Effect of different doses of transforming growth factor- β 1 on cartilage and subchondral bone in osteoarthritic temporomandibular joints [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 51(3): 241-246. DOI: 10.1016/j.bjoms.2012.05.014.
- [18] 周鹏,张月姣,张勉,等. 不同年龄小鼠下颌髁突软骨双侧前牙对反骀的响应[J]. *实用口腔医学杂志*, 2023, 39(1): 11-18. DOI:10.3969/j.issn.1001-3733.2023.01.002.
- [19] 刘美希. Wnt/ β -catenin 信号通路在功能矫形力过载致大鼠 TMJ OA 中的作用[D]. 青岛:青岛大学, 2020. DOI:10.27262/d.cnki.gqda.2020.001015.
- [20] Andrés - Manzano MJ, Andrés V, Dorado B. Oil red O and hematoxylin and eosin staining for quantification of atherosclerosis burden in mouse aorta and aortic root [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1339:85-99. DOI:10.1007/978-1-4939-2929-0_5.
- [21] 张月姣,徐小杰,刘倩,等. 偏颌大鼠模型的构建及其髁突CT影像和组织学评价[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2021, 31(5):278-284. DOI:10.3969/j.issn.1005-4979.2021.05.003.
- [22] Nogami S, Kataoka Y, Yamauchi K, et al. Condylar resorption following compressive mechanical stress in rabbit model - association of matrix metalloproteinases [J]. *In Vivo*, 2022, 36(5):2126-2133. DOI:10.21873/invivo.12938.
- [23] 万仕伟,方彭华,闵文. 骨钙素调节糖骨代谢研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(18):4628-4632. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2022.18.064.
- [24] 米娜,安玮,金雪梅,等. 叶黄素对兔创伤性颞下颌关节强直的预防作用研究[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2024, 22(3):216-221. DOI:10.19438/j.cjoms.2024.03.002.
- [25] Pfothner KM, Shubrook JH. Vitamin D deficiency, its role in health and disease, and current supplementation recommendations [J]. *J Am Osteopath Assoc*, 1998, 117(5): 301-305. DOI: 10.7556/jaoa.2017.055.
- [26] Bischoff-Ferrari HA, Kiel DP, Dawson-Hughes B, et al. Dietary calcium and serum 25 - hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(5):935-942. DOI: 10.1359/jbmr.081242.
- [27] Ibrahim AH, Omar HH, Imam AM, et al. 25-hydroxyvitamin D deficiency and predictive factors in patients with diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus [J]. *Egypt J Immunol*, 2018, 25(2):11-20.
- [28] 李静. 银川市学龄儿童青少年骨密度发育特征及其与维生素D的关系[D]. 银川:宁夏医科大学, 2018. DOI:CNKI:CDMD:2.1018.978122.
- [29] Tanabe R, Kawamura Y, Tsugawa N, et al. Effects of Fok - I polymorphism in vitamin D receptor gene on serum 25 - hydroxyvitamin D, bone - specific alkaline phosphatase and calcaneal quantitative ultrasound parameters in young adults [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2015, 24(2): 329-335. DOI: 10.6133/apjcn.2015.24.2.01.
- [30] 刘冬梅,白煜,苏曰超,等. 特发性髁突吸收患者髁突位置特征的CBCT研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2020, 36(2):365-368. DOI:10.3969/j.issn.1001-3733.2020.02.052.
- [31] Staniszewski K, Lygre H, Berge T, et al. Serum analysis in patients with temporomandibular disorders: A controlled cross-sectional study in Norway [J]. *Pain Res Manag*, 2019; 1360725. DOI:10.1155/2019/1360725.

(收稿日期:2024-07-08)

(本文编辑:王嫚)