

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0021-04

颞下颌关节滑膜炎动物模型的建立及组织病理学观察

陈彩云 丁寅 刘亚京 张雅博

(第四军医大学口腔医院 正畸科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 建立稳定的颞下颌关节(TMJ)滑膜炎动物模型。方法 将16只6周龄雄性SD大鼠随机分为4组, 分别是对照组、升高咬合组、切除咬肌组以及切除咬肌加升高咬合组。通过切除大鼠双侧咬肌来削弱咬合力以及在大鼠双侧上颌第一和第二磨牙上粘接树脂改变大鼠咬合垂直距离来诱导大鼠TMJ滑膜炎的发生。实验结束后取大鼠双侧TMJ作石蜡切片, 通过组织病理学诊断鉴定TMJ滑膜炎动物模型的确立。结果 对照组TMJ滑膜未出现炎症性改变; 升高咬合组和切除咬肌组出现滑膜下组织血管扩张和滑膜固有层细胞增生, 但2组间炎症表现差异无统计学意义($P>0.05$); 与升高咬合组和切除咬肌组相比, 切除咬肌加升高咬合组呈现明显的滑膜炎炎症特征性表现($P<0.05$), 包括滑膜下组织血管扩张、纤维素沉积、滑膜固有层细胞增生。结论 本研究所建立的TMJ滑膜炎的动物模型能较好地模拟滑膜炎的组织病理学变化过程, 且具有效果稳定、可重复性好的优点。

[关键词] 颞下颌关节; 咀嚼肌; 咬合垂直距离; 滑膜; 动物模型

[中图分类号] R 782.6 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.006

Establishment of animal model of temporomandibular joint synovitis and its histological investigation
CHEN Cai-yun, DING Yin, LIU Ya-jing, ZHANG Ya-bo. (Dept. of Orthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To establish a stable animal model of temporomandibular joint(TMJ) synovitis. **Methods** Sixteen 6-week-old male SD rats were classified into four groups, control group, occlusal dimension increase group, masseter resection group, occlusal dimension increase group and masseter resection group. The rats in the occlusal dimension increase group were adhered composite resin to their maxillary molars in order to increase the occlusal vertical dimension when they were 9-week-old. The rats in the masseter resection group were cut off their bilateral masseter muscles when they were 6-week-old. In the occlusal dimension increase group and masseter resection group, rats' bilateral masseter muscles were resected and occlusal vertical dimension was increased. All rats were sacrificed at their 10 weeks old. TMJ samples were prepared for histology to evaluate the animal model. **Results** The control group showed non-inflammatory changes. The occlusal dimension increase group and the masseter resection group showed vascular dilation and synovial lining proliferation, but there were no statistically significant differences between the two groups($P>0.05$). Compared to the two disposed groups, the occlusal dimension increase group and masseter resection group showed significant inflammatory changes($P<0.05$), including synovial lining proliferation, vascular dilation and fibrin deposit. **Conclusion** The animal model of TMJ synovitis created in the present investigation could simulate the real pathological features of synovitis *in vivo*, and this animal model showed the obvious merits of high stability and reproduction.

[Key words] temporomandibular joint; masticatory muscles; occlusal vertical dimension; synovium; animal model

滑膜炎是颞下颌关节紊乱病(temporomandibular disorder, TMD)中的重要类型之一, 也是一些顽固性疼痛的原因之一, 受到愈来愈多的关注。咬合距离的改变将导致髁突位置的改变, 引起咀嚼肌和

颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)一系列适应性和病理性的改变, 咀嚼力降低导致髁突形成减少和下颌升支高度降低, 是错殆患者垂直向不调的主要原因。有证据表明伴有垂直向不调的错殆患者更容易患TMD。目前对TMJ的研究主要集中于髁突软骨, 对滑膜的研究很少。临床上垂直向不调的正畸矫治非常困难, 并且在矫治过程中常常出现

[收稿日期] 2009-05-14; [修回日期] 2009-11-09

[作者简介] 陈彩云(1983—), 女, 江苏人, 硕士

[通讯作者] 丁寅, Tel: 029-84776138

TMJ的症状,本研究通过模拟这类患者的错骀,建立TMJ滑膜炎的动物模型,以此为载体探讨咀嚼肌活动和咬合的改变在关节病形成中的作用,为正畸临床预防和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

选取由第四军医大学动物实验中心提供的6周龄雄性SD大鼠16只,体质量为150~170 g,无明显全身疾患和口颌系统功能障碍。将实验动物随机分为4组,分别为对照组、升高咬合组、切除咬肌组、切除咬肌加升高咬合组,每组4只。

1.2 建立咀嚼力降低和升高咬合的动物模型

1.2.1 切除咬肌 将切除咬肌加升高咬合组、切除咬肌组SD大鼠的咬肌从咬肌附丽的起止点即从上颌骨颧突和颧弓下缘的前2/3到咬肌粗隆和下颌支外侧面的下半部完全切除,不应有残留,注意手术中勿伤及重要的血管神经,缝合时尽量减小死腔的大小,术后每天给予每只大鼠腹腔注射青霉素80万单位,注射3 d,防止感染。术后常规饮食。实验期为3周。

1.2.2 升高咬合 在切除咬肌加升高咬合组、升高咬合组共8只9周龄SD大鼠的双侧上颌第一和第二磨牙上直接粘接后牙用耐磨光固化树脂来制作骀垫,骀垫长7.0 mm、宽2.0 mm、高2.0 mm。实验期为1周。

1.3 标本的处理

于实验后第4周,大鼠10周龄时,在40 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉下,经心脏主动脉插管灌注0.9%的NaCl溶液(每只100 mL)和40 g·L⁻¹多聚甲醛溶液(pH=7.4)(每只400 mL),取出双侧颞下颌关节,40 g·L⁻¹多聚甲醛溶液固定24 h,置于150 g·L⁻¹乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)中脱钙1周,常规脱水,石蜡包埋,经髁突矢状面低温连续切片,厚度为5 μm。

1.4 组织形态学染色及图像分析

每个标本取左右关节各1张切片,共计32张。常规苏木精-伊红染色,在Olympus VANOX AHB3T3 万能显微镜下应用计算机DP Controller软件系统采图,在镜下(×200)由2名观察者在盲法下观察各样本组织形态学变化并计数,通过组织病理诊断鉴定颞下颌关节滑膜炎动物模型的确立。本实验主要观察关节盘的前带(anterior band, AB)下面和后带(posterior band, PB)被覆的滑膜组织(图1)。染色结果判断标准^[1]如下。滑膜衬里增生分为3个等级:1)0级为1~3层着色;2)1级为4~6层着色;3)2级为不小于

7层着色。血管扩张分为3个等级:1)0级为未出现;2)1级为累及小于1/3滑膜长度;3)2级为累及1/3~2/3滑膜长度。纤维素沉积的等级划分标准同血管扩张。

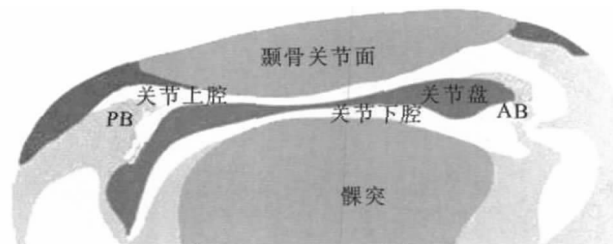


图1 大鼠颞下颌关节矢状面切片示意图

Fig 1 A schematic diagram of a sagittal section of the rat TMJ

1.5 统计学分析

应用统计软件SAS 9.1对数据进行统计分析,对等级资料采用Kruskal-Wallis H检验以及Nemenyi检验进行分析,所有样本均采用双侧检验,检验水准为0.05。

2 结果

2.1 体重变化

实验结束时,4组动物随着鼠龄的增加,体重逐渐增加,各组间体重变化无统计学意义($P>0.05$)(图2)。

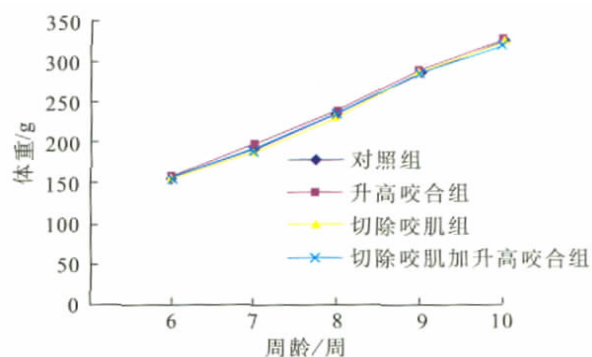
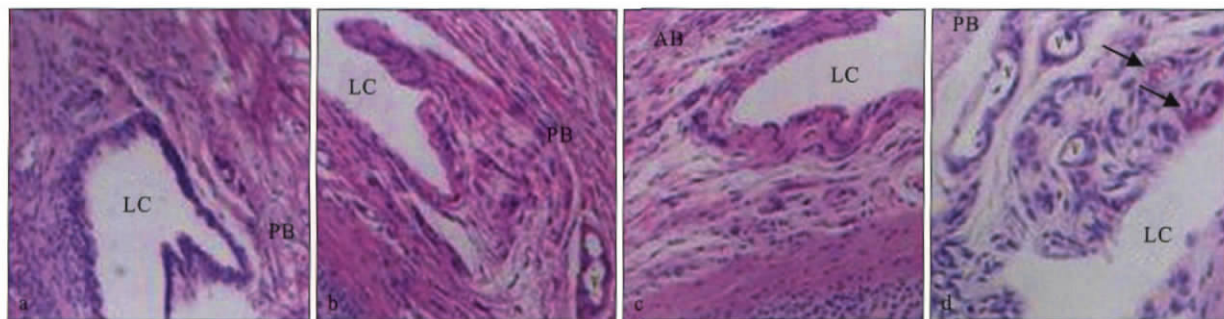


图2 4组大鼠的体重变化

Fig 2 The change of rats' weight in the four groups

2.2 滑膜组织学变化

对照组TMJ关节囊的内层光滑,固有层细胞不超过4层,滑膜下层中血管形态正常,组织排列规则,说明滑膜没有出现炎症性改变。在升高咬合组和切除咬肌组,固有层细胞层数增加,滑膜下层的血管形态不规则,管腔变大,发生血管扩张,但二者间固有层细胞增生和血管扩张间差异均无统计学意义($P>0.05$);与升高咬合组和切除咬肌组相比,切除咬肌加升高咬合组滑膜有明显的炎症($P<0.05$),包括固有层细胞明显增生,滑膜下层血管明显扩张,管腔内出现明显红染的无定形物质即纤维素沉积(图3)。组织学染色结果计数见表1。



a: 对照组; b: 升高咬合组; c: 切除咬肌组; d: 切除咬肌加升高咬合组; LC: 关节下腔; “→”示纤维素渗出沉积。

图3 组织形态学的变化 HE ×200

Fig 3 Histomorphology changes HE ×200

表1 各组样本滑膜组织形态学变化结果

Tab 1 The morphological changes of synovial tissue of each group

分组	滑膜衬里增生			血管扩张			纤维素沉积		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
对照组	8	0	0	8	0	0	8	0	0
升高咬合组	6	2	0	0	6	2	7	1	0
切除咬肌组	5	3	0	0	7	1	7	1	0
切除咬肌加升高咬合组	1	4	3	0	4	4	1	5	2

3 讨论

本研究采用切除大鼠双侧咬肌和升高咬合垂直距离来诱导大鼠TMJ滑膜的炎症损害,在切除咬肌加升高咬合组观察到明显的滑膜炎表现,说明了该方法所致病变的一致性以及良好的可重复性。

有学者^[2]测量Wistar大鼠的息止颌间隙是1 mm。咬合升高2 mm是其最大张口时磨牙区间隙的30%,认为咬合升高2 mm属于生理范围^[3]。故本实验将大鼠的咬合升高了2 mm。由于构成咀嚼肌的肌肉超过50%为咬肌,并且咬合力的大小与咬肌厚度直接相关^[4],因此本研究选择切除咬肌来削弱咀嚼力。咬肌切除后颞肌和翼外肌产生代偿参与咀嚼运动^[1],另外瘢痕的形成也是一种补偿^[5],使得各组动物的体重变化差异无统计学意义。

TMJ滑膜组织可分为固有层和滑膜下层。固有层为细胞内膜,通常由1~4层滑膜细胞构成,其下方并无基底膜样结构,细胞间为无定形间质,不含纤维。滑膜下层为疏松结缔组织,含有血管和神经以及成纤维细胞、巨噬细胞、肥大细胞、脂肪细胞等细胞成分。滑膜固有层与滑膜下层无明显界限^[6]。

在升高咬合组观察到血管扩张。由于滑膜组织对垂直距离的改变较敏感,尤其是滑膜皱襞处,该处是分泌滑液的主要部位。张红梅等^[7]研究发现升高大鼠的咬合后,在实验第7天观察到TMJ有退行性改变,这与本研究观察到的结果一致。然而由于作

用时间短,刺激小,滑膜组织只是发生了轻微的急性炎症反应。发生急性炎症时组织的改变主要是以血管反应为中心的渗出性变化,血管的变化最早也最明显。而纤维素是由纤维蛋白渗出到血管外,在坏死物质释放的组织因子作用下转化而来,只有在毛细血管和小静脉损伤较重,血管通透性明显升高时才能出现纤维素渗出沉积在管腔内,因此,在升高咬合组可观察到血管扩张,而纤维素渗出很少。

在切除咬肌组固有层细胞发生增殖,这可能是手术本身造成的慢性炎症反应,滑膜组织发生适应性的改建,随着时间的推移,组织的炎症反应将逐渐消退,但这需要进一步的研究来证实。Yonemitsu等^[8]观察了切除发育期大鼠咬肌的动物成年后下颌的发育情况,发现切除咬肌的大鼠成年后髁突长度和下颌升支高度降低,进一步研究还发现咬肌切除后成软骨细胞带厚度变薄,尤其是增殖带,其发生机制可能是咬肌切除后咬合力降低,对髁突表面的压力载荷减少,引起成软骨细胞的增殖和分化减少。这说明过小的咬合力对TMJ和下颌的发育不利,然而Lucchinetti等^[9]研究发现咬合力过大也会导致关节的退行性改变。本实验中观察到固有层细胞有少量增生,而血管扩张和纤维素渗出并不明显,因此认为咀嚼力降低对髁突软骨的影响较大,而对TMJ滑膜的炎症损害不明显,这与Tanne^[10]的观点一致。

在切除咬肌加升高咬合组可以观察到明显的炎症反应,固有层细胞增生、滑膜下组织的血管扩张和纤维素沉积,这与Ozaki等^[11]观察到的结果一致。垂直距离的不调对TMJ滑膜、翼外肌上头和咬肌的影响最为显著^[11],其中又以盘前伸部翼外肌上头附丽部和盘外侧咬肌附丽部尤为显著。垂直向不调往往使咀嚼肌张力增高,其张力必然要传导到肌肉附丽部,如翼外肌上头髁侧端、部分附丽于软的关节盘前伸部、部分附丽于硬的髁突颈部,这就使得收缩时的张力变化出现差异,肌肉的稳定性降低,可

见垂直向不调打破了咀嚼肌系统和TMJ平衡。切除咬肌后,进一步加剧了咀嚼肌和TMJ内部的不平衡,这种不平衡超过了机体的适应能力,发生了一系列生理、生化、免疫以及炎症反应^[12]。滑膜细胞可以分泌多种细胞因子,如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等,这些细胞因子对关节的破坏、各种症状的产生有密切的关系^[6]。滑膜组织在各种细胞因子的复杂作用下发生滑膜细胞增生、血管扩张、纤维素渗出沉积等炎症性关节炎的特征性改变之一。

大鼠TMJ滑膜炎模型具有可重复性、短期内发生以及良好的相似性三大要素,符合动物模型的基本要求。此外SD大鼠性情较温顺,价格便宜,易于饲养,耐受力强,其咬肌运动与人类相似^[13],且位置表浅,手术容易,并且相同周龄的大鼠磨牙大小基本相同,口内树脂垫大小一致,故不失为研究伴有垂直向不调正畸患者TMD病理改变、发病机制及治疗的较为理想的实验动物模型。

【参考文献】

- [1] Ozaki M, Kaneko S, Soma K. Masseter muscular weakness affects temporomandibular synovitis induced by jaw opening in growing rats[J]. Angle Orthod, 2008, 78(5) :819-825.
- [2] Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Histologic changes in rat masticatory muscles subsequent to experimental increase of the occlusal vertical dimension[J]. J Prosthet Dent, 1983, 50(5) :725-732.
- [3] Rabie AB, Hägg U. Factors regulating mandibular condylar growth[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2002, 122(4) :401-409.
- [4] Raadsheer MC, van Eijden TM, van Ginkel FC, et al. Contribution of jaw muscle size and craniofacial morphology to human bite force magnitude[J]. J Dent Res, 1999, 78(1) :31-42.
- [5] Sakurai M, Yonemitsu I, Muramoto T, et al. Effect of masticatory muscle force on temporomandibular joint disc growth in rats[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(12) :1186-1193.

(上接第20页)

- [3] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells[J]. J Dent Res, 2003, 82(12) :950-955.
- [4] Jeremy A, Mao J. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(7) :911-923.
- [5] Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, et al. *In vivo* bone engineering in a rabbit femur[J]. J Craniofac Surg, 2003, 14(3) :324-332.
- [6] 郝建原, 邓先模. 复合生物材料的研究进展[J]. 高分子通报, 2002, 10(1) :1-8.
HAO Jian-yuan, DENG Xian-mo. Research progress of composite biomaterials[J]. Macromolecules, 2002, 10(1) :1-8.
- [7] 程琳, 李玉宝, 左奕, 等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺多孔支架材

- [6] 谷志远. 颞下颌关节紊乱病的组织病理学及软骨生物学[M]//谷志远, 傅开元, 张震康. 颞下颌关节紊乱病. 北京:人民卫生出版社, 2008 :49-52.
GU Zhi-yuan. Histopathology and cartilage biology of temporomandibular disorder[M]//GU Zhi-yuan, FU Kai-yuan, ZHANG Zhen-kang. Temporomandibular disorder. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008 :49-52.
- [7] 张红梅, 丁寅, 王欢, 等. 升高咬合对青春大鼠髁突软骨改建的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6) :524-526.
ZHANG Hong-mei, DING Yin, WANG Huan, et al. Influences of occlusal vertical rising on condylar cartilage remodeling in adolescent rats[J]. J Fourth Military Medical University, 2007, 28(6) :524-526.
- [8] Yonemitsu I, Muramoto T, Soma K. The influence of masseter activity on rat mandibular growth[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(5) :487-493.
- [9] Lucchinetti E, Adams CS, Horton WE Jr, et al. Cartilage viability after repetitive loading: A preliminary report[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(1) :71-81.
- [10] Tanne K. Degenerative changes of articular cartilage in association with mechanical stimuli[J]. Jap Dent Sci Rev, 2008, 44(1) :38-47.
- [11] 王海鹰, 周继林, 洪民, 等. 咬合创伤颞颌关节软组织前列腺素E2的分泌及变化[J]. 实用口腔医学杂志, 1997, 13(1) :44-46.
WANG Hai-ying, ZHOU Ji-lin, HONG Min, et al. The secretion of prostaglandin E2 of temporomandibular joint soft tissue after occlusal traumatism[J]. J Pract Stomatol, 1997, 13(1) :44-46.
- [12] 张震康, 谷志远, 傅开元. 颞下颌关节紊乱病的病因学[M]//谷志远, 傅开元, 张震康. 颞下颌关节紊乱病. 北京:人民卫生出版社, 2008 :96-102.
ZHANG Zhen-kang, GU Zhi-yuan, FU Kai-yuan. Etiology of temporomandibular disorder[M]//GU Zhi-yuan, FU Kai-yuan, ZHANG Zhen-kang. Temporomandibular disorder. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008 :96-102.
- [13] Macdougall JD, Andrew BL. An electromyographic study of the temporalis and masseter muscles[J]. J Anat, 1953, 87(1) :37-45.

(本文编辑 王晴)

- 料的制备及其结晶行为研究[J]. 功能材料, 2007, 38(1) :47-52.
CHENG Lin, LI Yu-bao, ZUO Yi, et al. Preparation of nano-hydroxyapatite/polyamide 6 composite and crystal properties of this porous scaffold[J]. Funct Mater, 2007, 38(1) :47-52.
- [8] 蓝旭, 文益民, 葛宝丰, 等. 骨髓基质干细胞复合纳米羟基磷灰石/聚乳酸修复节段性骨缺损[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 21(10) :797-800.
LAN Xu, WEN Yi-min, GE Bao-feng, et al. Repair of segmental bone defect by fabrication of tissue engineering bone with bone marrow stromal cells and nano-hydroxyapatite/poly(lactic acid) [J]. Chin J Bone Joint Injury, 2006, 21(10) :797-800.

(本文编辑 汤亚玲)