

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.02.014

· 综述 ·

大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死模型的建立

刘杰¹ 综述; 唐华² 审校

1. 四川大学华西口腔医学院, 四川 成都(610041); 2. 四川大学华西口腔医院种植科, 四川 成都(610041)

【摘要】 随着双膦酸盐在治疗骨质疏松和骨恶性肿瘤等疾病方面的应用,双膦酸盐相关性颌骨坏死作为较严重的副作用受到广泛关注。双膦酸盐相关性颌骨坏死的动物模型是研究该疾病的良好途径,其中又以大鼠模型为常见。本文就大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死模型的建模方法和建模检测方式做综述。

【关键词】 双膦酸盐; 颌骨坏死; 大鼠模型; 骨质疏松; 骨恶性肿瘤

【中图分类号】 R782 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)02-133-04

【引用著录格式】 刘杰,唐华.大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死模型的建立[J].口腔疾病防治,2017,25(2):133-136.

The establishment of a bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw rat model LIU Jie¹, TANG Hua².

1. West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: TANG Hua, Email: tanghwa@126.com, Tel: 0086-28-85503571

【Abstract】 With the wide use of bisphosphonates in bone diseases such as osteoporosis and bone metastases of malignant tumors, bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw has gained widely attention as a severe side effect. Animal model is a useful way to study bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, among which rat model is used most usually. This article reviewed the establishment of rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw and relevant examinations.

【Key words】 Bisphosphonates; Osteonecrosis; Rat model; Osteoporosis; Bone malignancy

双膦酸盐(bisphosphonates, BPs)可以有效提高骨矿物质密度和骨强度,并抑制骨吸收,但其与颌骨坏死有关联^[1]。随着双膦酸盐在治疗骨质疏松症和一些恶性肿瘤如多发性骨髓瘤、乳腺癌和前列腺癌骨转移等方面的使用,越来越多的双膦酸盐引起颌骨坏死的案例被报道^[2-4]。自从2003年第一例双膦酸盐相关性颌骨坏死(bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, BRONJ)报道以来, BRONJ的致病机理开始被众多学者广泛研究^[5]。动物模型是研究其致病机理的一种良好途径,其中

大鼠模型又最为常见。近年来诸多学者在BRONJ的相关研究中使用了大鼠模型,更加简便且行之有效的模型建立方法也在不断研究中。

1 建模方法

1.1 注射双膦酸盐

雌性SD大鼠是最常使用的大鼠,只有少数研究采用的是雄性Wistar大鼠,但仍没有证据证明采用不同的大鼠有何区别^[6-9]。各实验使用双膦酸盐主要是唑来膦酸盐(Zoledronic, ZA)和帕米膦酸盐(Pamidronic, PA),并且采用不同的注射剂量和频次。ZA是最有效的双膦酸盐,其导致实验动物患BRONJ的概率最高^[10]。Barba-Recreo等^[9]在报告中总结了药物剂量和大鼠BRONJ发生率的关系。Howie等^[10]也作了类似的总结。近几年来大鼠BRONJ模型建立的方法和发生率总结见表1。

【收稿日期】 2015-12-04; **【修回日期】** 2016-02-20

【基金项目】 国家自然科学基金(81300906);ITI国际合作项目(973-2014)

【作者简介】 刘杰,本科生, Email: 1183571448@qq.com

【通讯作者】 唐华,副主任医师,博士, Email: tanghwa@126.com

表1 大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死模型建立方法

作者及年份	注射方式	注射剂量及频率	促进措施	发生率
Howie 等 (2015) ^[10]	静脉注射	ZA: 80 μg/kg/7 d, 注射13周	拔除左侧上颌第一磨牙, 一周后拔除同侧上颌第二磨牙	100%
Yang 等 (2015) ^[11]	静脉注射	ZA: 80 μg/kg/7 d, 注射15周	拔除双侧上颌第一磨牙	出现患病, 未提及具体成功率
Borke 等 (2015) ^[12]	静脉注射	ZA: 60 μg/kg, 注射2次, 间隔1周	拔除右侧下颌第一磨牙	80%
Jang 等 (2015) ^[13]	腹腔注射	ZA: 0.2 mg/kg/7 d, 5 mg/kg/7 d DX, 注射4周	拔除左侧上下颌第一二磨牙	67%
Silva 等 (2015) ^[7]	静脉注射	ZA: 0.2 mg/kg/7 d 或 1 mg/kg/7 d, 持续注射3周, 35天后再次注射1次	拔除第一磨牙	100%
Jabbour 等 (2014) ^[14]	腹腔注射	ZA: 0.13 mg/kg/7 d, DX: 0.38 mg/kg/7 d, 注射7周	拔除第一磨牙	出现患病, 未提及具体成功率
Dayisoylu 等 (2014) ^[15]	腹腔注射	ZA: 0.1 mg/kg, 每周3次, 注射8周	拔除右侧第一磨牙	67%
Sarkarat 等 (2014) ^[16]	静脉注射	ZA: 0.04 mg, 每周注射1次, 注射5周	拔除下颌第一磨牙	出现患病, 未提及具体成功率
Li 等 (2014) ^[17]	腹腔注射	ZA: 66 μg/kg, 每周注射3次, 注射12周	卵巢切除手术; 将一根棉线置于左侧下颌第一磨牙	所有大鼠无临床表现; 少量有组织学表现
Barba-Recreo 等 (2014) ^[9]	腹腔注射	ZA: 0.1 mg/kg, 每周注射3次, 注射9周	拔除右侧上颌磨牙	80%骨坏死; 100%未出现骨吸收
Tsurushima 等 (2013) ^[6]	皮下注射	ZA: 0.1 mg/kg/7 d, 注射4周	伴放线杆菌冻干株注射进下颌骨髓	类似BRONJ的坏死
Dayisoylu 等 (2013) ^[18]	腹腔注射	ZA: 0.1 mg/kg, 每周注射3次, 注射8周	拔除右侧第一磨牙	66%
Marino 等 (2012) ^[19]	静脉注射	ZA: 20 μg/kg 的剂量注射2次, 每针间隔2周	拔除右侧下颌第一磨牙近中根	75%
Hokugo 等 (2010) ^[20]	静脉注射	ZA: 35 μg/kg 每两周注射1次, 共注射5次	拔除左侧上颌第一磨牙; 维生素D缺乏	67%

注 ZA: 唑来膦酸盐; DX: 地塞米松; BRONJ: 双膦酸盐相关性骨坏死。

1.2 辅助措施

除了注射双膦酸盐, 不同的实验采取了其他的辅助措施来促进BRONJ的发生, 包括拔牙手术、注射地塞米松、构建维生素D缺乏模型和诱发牙周病。

1.2.1 拔牙手术 拔牙手术几乎见于所有构建大鼠BRONJ模型的实验, 因其可提高BRONJ发生概率, 并且不愈合的口腔创伤是鉴定BRONJ的标准之一^[12]。本文以下颌第一磨牙为例介绍一种常见的拔牙构建大鼠BRONJ模型方法。

对实验动物以0.5 mL/kg的剂量肌肉注射氯胺酮(100 mg/mL)、甲苯噻嗪(20 mg/mL)和乙酰丙嗪(10 mg/mL)的混合液。为缓解疼痛可按0.3 mg/kg的剂量注射丁丙诺啡。用两根橡皮筋来保持大鼠口腔的张开状态并固定舌头的位置, 橡皮筋固定到牙科橡胶框架以保证手术视野的清晰。用一个小(1 mm)的牙龈分离器对牙周韧带行韧带切开术。使用上述分离器和改进的止血钳拔除下颌第一磨牙的牙冠, 并用一个锥形圆头锉调整拔牙

区从釉牙骨质界深度为2 mm, 观察大鼠状态直到大鼠从麻醉中苏醒。手术后喂养1周的软食以减少咀嚼坚硬食物的创伤^[12]。此外, 有文献提到拔牙窝的骨密度在4周后稳定^[12], 所以骨质相关的检测需在拔牙后4周左右进行。

1.2.2 注射地塞米松 在Jabbour等^[14]的报告中, 将44只大鼠随机分成5个组: ZA和DX组每周注射唑来膦酸盐和地塞米松持续注射7周; WD组唑来膦酸盐和地塞米松注射3周, 然后单独注射地塞米松4周; C组为对照组, 注射7周生理盐水; ZA组单独注射唑来膦酸盐7周; DX组单独注射地塞米松7周。结果表明, ZA和DX组大鼠没有拔牙的一侧颌骨骨组织体积分数最高, 同时ZA和DX组大鼠骨量和死骨表面积最大。其他报告也得出相似的结论^[21-23]。

1.2.3 维生素D缺陷 在Hokugo等^[20]的实验中, 通过喂食缺乏维生素D的食物建立了一个维生素D缺陷的大鼠模型(VitD[-]), 然后再对正常大鼠(VitD[+])和维生素D缺陷的大鼠注射ZA。最后, VitD[-]组大鼠颌骨坏死的概率是66.7%, 明显

高于其余组。

1.2.4 诱发牙周病 Li等^[17]为探究牙周病与BRONJ的联系,对大鼠实行双侧卵巢切除,然后将一根棉线放在下颌第一磨牙龈下以诱发牙周炎。最后,micro-CT检查结果显示,在实验组和对照组都造成明显的牙槽骨丧失。

Tsurushima等^[6]用放线杆菌冻干株研究牙周病与BRONJ的联系,实验组大鼠于下颌骨骨髓注射放线杆菌冻干株和完全弗氏佐剂,对照组则是注射生理盐水。

1.3 方法对比

临床上关于口服给药和静脉注射时BRONJ的发生概率有不同的讨论:Otto等^[24]报道口服和静脉注射对BRONJ的发生差异无统计学意义;Rosini等^[25]在实验中提到口服双膦酸盐类药物(阿仑膦酸钠、利塞膦酸、伊班膦酸钠)时BRONJ发生率极低;但也有报道称静脉注射时BRONJ发生率明显高于口服,发病率可达9.64%^[26]或3.6%^[27]。

各种建模方法都有各自的特点。Howie等^[10]采用较低剂量和重复拔牙,重复创伤足以引发持续、典型的BRONJ,不必提前人为诱发口腔或全身疾病。Silva等^[7]的实验中,0.2 mg的ZA实验组与临床用量一致,可以较好地评估和再现临床情况。而持续腹腔注射DX可以增加BRONJ的发生率,切除实验组动物的卵巢能模拟人类皮层内部骨重塑过程^[17],而采用冻干菌株注射和放置棉线得到的BRONJ发生率不高^[17],病变不典型^[6]。不同实验根据自身需要而采用了不同的方法。

2 建模检测方式

2.1 大体观察

美国国际癌症学会颁布了一个评价临床患者骨坏死的通用标准^[28],按病灶面积(以最大病灶直径计算)分为表2所示的4个等级,对大鼠的评价可以此为参考。

表2 美国国际癌症学会颁布的评价骨坏死的通用标准

等级	病灶数目	直径
1A	单个病灶	< 0.5 cm
1B	多个病灶	最大直径 < 0.5 cm
2A	单个病灶	0.5 ~ 0.99 cm
2B	多个病灶	最大直径 0.5 ~ 0.99 cm
3A	单个病灶	1 ~ 2 cm
3B	多个病灶	最大直径 1 ~ 2 cm
4A	单个病灶	> 2 cm
4B	多个病灶	最大直径 > 2 cm

其他文献也提到了在实验性大鼠口腔BRONJ的鉴定方法:坏死颌骨暴露,持续性黏膜不愈合^[10];拔牙手术后有4周以上的开放性伤口^[29];口腔黏膜不完全覆盖坏死牙槽骨,有死骨形成^[13]。

2.2 Micro-CT检测

Bedogni等^[30]发现临床BRONJ患者拔牙区骨重塑延缓或者不发生骨重塑,他们的CT扫描具有以下特征:早期下颌骨病变,观察到弥散性骨硬化;在一例晚期下颌骨病变中发现有广泛的骨膜反应和大片死骨形成;髓质骨和皮质骨密度增加。Li等^[17]报道了BRONJ大鼠的扫描特征:双膦酸盐注射组骨小梁连接良好,形成网状结构,但对照组呈现分离和零散;双膦酸盐注射组骨密度和骨量百分比明显高于对照组;双膦酸盐注射组骨小梁厚度高于对照组,然而骨小梁数目和小梁间隙明显降低。其余特征还有:从下颌骨分离的骨碎片和骨重塑减少^[10,14];颌骨不完全愈合^[13]。

2.3 组织切片观察

组织切片观察是检验的常用方法。对标本作以下处理:将其置于质量分数14.5%乙二胺四乙酸(pH值7.2)中脱钙4~6周,每周更换2~3次溶液。然后分别置于体积分数70%、95%、100%的乙醇中脱水,最后进行石蜡包埋。第一磨牙近远中向切片,厚度为5 μm^[17]。

动物模型实验中患病个体除了外观上能看到不完全愈合的伤口^[7,9,15]之外,在组织切片上还有以下特征:拔牙区不见矿化骨基质沉积^[7];淋巴细胞浸润^[7,9,11-12,18,20];新骨形成减少^[8,17];坏死骨伴有陷窝^[6,10-12,15,20]。

3 总结

BRONJ的致病机理目前为止还不完全清楚,要弄清人类BRONJ所有复杂的情形仍然充满挑战^[10]。动物模型是研究BRONJ必不可少的手段,而其中大鼠模型是一个较为简便又能较好模拟人类的模型^[11]。迄今为止,研究BRONJ中某些致病环节的大鼠模型都取得相应成果,通过大鼠模型可以观察到和人类相似的症状。通过更深入的探究,将来大鼠模型会为研究BRONJ提供更重要的帮助,从而促进人类BRONJ的治疗和预防^[13]。

参考文献

- [1] 华洪飞,王宁涛,张文杰,等.双膦酸盐致颌骨坏死的大鼠模型研究[J].口腔颌面外科杂志,2016,26(1):19-24.
- [2] Eastell R, Walsh JS, Watts NB, et al. Bisphosphonates for post-

- menopausal osteoporosis[J]. *Bone*, 2011, 49(1): 82-88.
- [3] Drake MT, Clarke BL, Khosla S, et al. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(9): 1032-1045.
- [4] Reid IR, Lyles K, Su G, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(9): 2261-2270.
- [5] Hasegawa T, Ri S, Umeda M, et al. The observational study of delayed wound healing after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy[J]. *J Cranio Maxillofac Surg*, 2013, 41(7): 558-563.
- [6] Tsurushima H, Kokuryo S, Sakaguchi O, et al. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 42(11): 1481-1487.
- [7] Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate related osteonecrosis[J]. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60(9): 1237-1245.
- [8] Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2011, 16(7): 879-883.
- [9] Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, et al. Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014, 42(6): 744-750.
- [10] Howie RN, Borke JL, Kurago Z, et al. A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): 0132520.
- [11] Yang H, Pan H, Yu F, et al. A novel model of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5161-5167.
- [12] Borke JL, McAllister B, Harris T, et al. Correlation of changes in the mandible and retina/choroid vasculature of a rat model of BRONJ[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2015, 43(7): 1144-1150.
- [13] Jang HW, Kim JW, Cha IH. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) [J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2015, 37(1): 18.
- [14] Jabbour Z, El-Hakim M, Henderson JE, et al. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions[J]. *Oral Oncology*, 2014, 50(5): 485-490.
- [15] Dayisoylu EH, Üngör C, Tosun E, et al. Does an alkaline environment prevent the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? An experimental study in rats[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014, 117(3): 329-334.
- [16] Sarkarat F, Kalantar Motamedi MH, Jahanbani J, et al. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws[J]. *Trauma Mon*, 2014, 19(2): 17196.
- [17] Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, et al. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats[J]. *Clin Oral Impl Res*, 2016, 27(1): 1-6.
- [18] Dayisoylu EH, Şenel FÇ, Üngör C, et al. The effects of adjunctive parathyroid hormone injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an animal study[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 42(11): 1475-1480.
- [19] Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) [J]. *J Oral Implantol*, 2012, 38(3): 511-518.
- [20] Hokugo A, Christensen R, Chung EM, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(6): 1337-1349.
- [21] Bi Y, Gao Y, Ehrichiou D, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(1): 280-290.
- [22] López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, et al. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats[J]. *J Oral Pathol Med*, 2010, 39(9): 697-702.
- [23] Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone[J]. *J Oral Pathol Med*, 2012, 41(6): 494-499.
- [24] Otto S, Tröltzsch M, Jambrovic V, et al. Tooth extraction in patients receiving oral or intravenous bisphosphonate administration: A trigger for BRONJ development? [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2015, 43(6): 847-854.
- [25] Rosini S, Rosini S, Bertoldi I, et al. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(17): 3309-3317.
- [26] Kos M. Incidence and risk predictors for osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates[J]. *Arch Med Sci*, 2015, 25, 11(2): 319-324.
- [27] Günaldi M, Afsar CU, Duman BB, et al. Effect of the cumulative dose of zoledronic acid on the pathogenesis of osteonecrosis of the jaws[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(1): 439-442.
- [28] Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF, et al. Critical review: Updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients—May 2006[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(2): 148-152.
- [29] Guevarra CS, Borke JL, Stevens MR, et al. Vascular alterations in the Sprague-Dawley rat mandible during intravenous bisphosphonate therapy[J]. *J Oral Implantol*, 2015, 41(2): 24-29.
- [30] Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008, 105(3): 358-364.

(编辑 全春天)