

SD大鼠外伤性特纳牙模型建立及微观结构观察

高黎¹, 郭 珊², 李艺博², 卢丽雯², 张彦喜²

摘要 目的 建立SD大鼠外伤性特纳牙模型,使用扫描电子显微镜(SEM)观察其表面结构和进行能谱分析(EDS)。方法 将40只1 d龄SD大鼠随机分为四组,每组10只。对照组:不做任何处理;实验组:分别垂直于大鼠下颌前牙区牙槽突加力,分5 N力组、10 N力组、15 N力组。受力面积均为2.5 mm×2.0 mm。30 d龄时处死大鼠,分别记录其下颌中切牙釉质情况,并通过SEM观察正常釉质、发育不全釉质微观结构及进行能谱分析。结果 对照组牙齿釉质正常,均正常萌出;5 N力组牙釉质发育不全率10%(釉质变色2颗),未萌0颗;10 N力组牙釉质发育不全率80%(釉质变色12颗,釉质缺损4颗),未萌1颗;15 N力组牙釉质发育不全率60%(釉质变色3颗,釉质缺损9颗),未萌7颗。10 N力组与15 N力组未萌牙差异有统计学意义($P < 0.05$),SEM下釉质发育不全部分区域釉质表面粗糙伴裂纹,部分区域凹凸不平。EDS结果显示釉质发育不全区钙磷含量较正常釉质低($P < 0.05$)。结论 牙胚外伤可引起釉质发育不全和未萌牙,5 mm²受力面施加10 N力适合建立大鼠外伤性特纳牙模型。外伤性特纳牙表面釉质粗糙,凹凸不平,钙磷含量减少。

关键词 SD大鼠;特纳牙;外伤;釉质发育不全

中图分类号 R 788.4;R 788.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0731-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.011

特纳牙是指由局部感染和创伤引起的牙齿釉质发育不全,好发于前磨牙。近年来,个别前牙尤其上颌切牙颜色或形态改变在临床上比较常见,主要表现为前牙釉质表面呈黄色至棕黄色改变,多位于上前牙唇面切1/3至中1/3,黄染区域与正常釉质交界清晰,形状不规则,严重者釉质表面或可出现明显缺损。这种前牙釉质颜色和形态改变,影响患者美观及心理。其表现为典型的特纳牙,但在临床上常被误认为氟斑牙。该研究通过对SD大鼠下颌前牙

区牙槽突垂直黏膜施加外力,建立外伤性特纳牙大鼠模型,观察外伤性釉质发育不全的临床表现,并进行微观结构观察和能谱分析(energy dispersive spectrometry, EDS),研究前牙区外伤是否出现特纳牙性釉质发育不全,为后期研究大鼠特纳牙和氟斑牙的相关区别提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设备 一次性口腔器械盒,眼科剪,镊子,持针器,手术刀及手术刀柄,木棒(一端接触面积2.5 mm×2.0 mm),0.9%氯化钠溶液,蒸馏水;0~20牛(N)弹簧秤(昆山托普泰克公司);游标卡尺(上海美耐特公司);Nikon相机(日本尼康公司);扫描电子显微镜(scanning electronic microscopes, SEM)、EDS能谱分析仪(德国ZEISS公司)。

1.2 实验动物与分组 郑州大学动物实验室提供的40只1 d龄SD大鼠作为受试对象,随机分为四组(性别、体质量差异无统计学意义),即对照组和3个实验组,每组10只;实验组依据施力分为5 N力组、10 N力组、15 N力组。

1.3 实验方法 对照组不做任何处理;实验组在大鼠下颌前牙区垂直于黏膜加力(图1),施力工具是木棒柱形压力装置,木棒一端与牙槽突接触,接触面积2.5 mm×2.0 mm;另一端与弹簧秤相连,分别施加5、10、15 N力(图2),在弹簧秤刻度的5、10、15、20 N处设置明显标记。在瞬间施力时,在弹簧秤示数达到所需要的最大力值时即停止施力。相同条件下饲养,观察下颌切牙的生长状况。SD大鼠在出生后30 d,下颌第一磨牙牙根发育基本完成,咬合关系稳定,此时引颈处死大鼠。剥离下颌骨下切牙段,0.9%氯化钠溶液、蒸馏水反复冲洗干净。

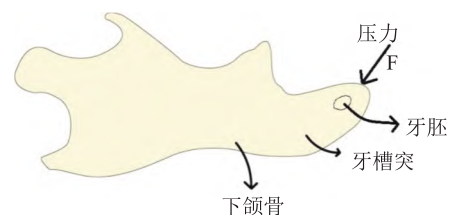


图1 受力示意图

2022-03-18 接收

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(编号:172102310487);河南省高等学校重点科研项目(编号:18A310037)

作者单位:郑州大学第一附属医院¹ 儿童口腔科、² 口腔颌面外科, 郑州 450052

作者简介:高黎,女,博士,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: gaolidoc@126.com



图2 施力图

A:5N 力组;B:10N 力组;C:15N 力组

1.4 记录标准 牙体唇面釉质出现变色,表面光滑、完整,记录为釉质变色;牙体唇面釉质出现粗糙、凹坑状、缺损,即记录为釉质缺损;釉质缺损和釉质变色同时出现,则记为釉质缺损。

1.5 SEM 观察及钙磷分析 选取实验组釉质发育不全区域与对照组相对应的釉质正常区域,制成实验所需的釉质块,放入无水乙醇中超声震荡清洗 5 min,然后将样本干燥处理,用导电胶固定在载物台上,放入真空镀膜机中,用 SEM 对牙釉质表面结构进行观察,并检测牙釉质表面钙(Ca)磷(P)元素含量的质量分数。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行数据录入和统计分析,采用 χ^2 检验对四组 SD 大鼠下颌切牙的正常牙数和釉质不全数及对 10N 力组和 15N 力组未萌牙数进行差异性比较,检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$;组间两两比较采用 Bonferroni 法,检验水准为 $\alpha = 0.008$ 。对实验组发育不全的牙釉质与对照组正常牙釉质 Ca、P 含量采用两独立样本 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 不同组外伤后一般情况 在实验过程中,实验

动物创面愈合良好,未发生感染和死亡。对照组 SD 大鼠下颌切牙区黏膜红润;5N 力组 SD 大鼠受力部位黏膜有轻微红色压痕;10N 力组受力部位黏膜大部分有深的压痕,有黏膜下血斑形成,有 5 例穿破黏膜,出血,但未刺破骨皮质;15N 力组受力部位黏膜穿破 10 例,出血,但均未穿破其下颌骨皮质。

2.2 30 d 龄 SD 大鼠下颌切牙各个标准大体表现

釉质正常:牙齿表面光滑无缺损,颜色均匀,呈淡黄色,透明度好(图 3)。釉质着色:主要表现为白斑,表面光滑,完整,透明度降低(图 4)。釉质缺损:釉质表面粗糙出现凹坑状缺损(图 5)。牙齿未萌:牙齿未完全萌出(图 6)。

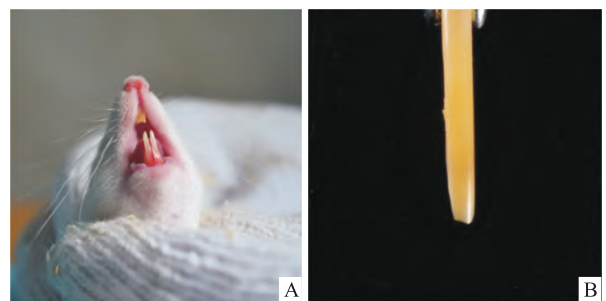


图3 釉质正常牙齿

A:下颌切牙大体观 B:下颌切牙冠状面观

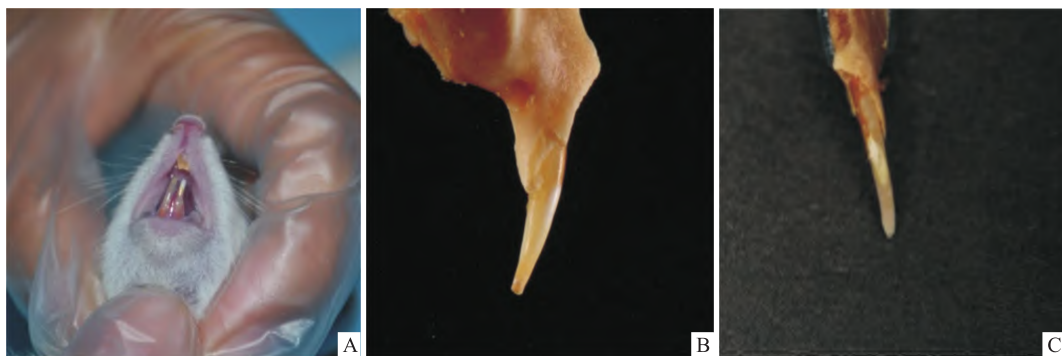


图4 牙齿釉质白色斑块

A:下颌切牙大体观 B:下颌切牙矢状面观 C:下颌切牙冠状面观



图5 牙齿釉质缺损

A: 下颌切牙大体观 B: 下颌切牙矢状面观 C: 下颌切牙冠状面观



图6 下颌切牙单个牙萌出

A, B: 下颌切牙大体观

组与 15N 力组 ($\chi^2 = 1.111, P = 0.496$), 其余各组间比较 P 值均 < 0.008 。10N 力组 (1/19) 和 15N 力组 (7/13) 间未萌牙数/已萌牙数差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.625, P = 0.018$)。见表 1。

表1 四组 30 d 龄 SD 大鼠下颌切牙发育情况 (n)

组别	釉质发育不全			未萌牙	合计	釉质发育不全率 (%)
	釉质正常	釉质变色	釉质缺损			
对照	20	0	0	0	20	0
5N 力	18	2	0	0	20	10
10N 力	3	12	4	1	20	80
15N 力	1	3	9	7	20	60

2.3 四组 30 d 龄 SD 大鼠下颌切牙发育情况 对照组、5N 力组、10N 力组、15N 力组四组 SD 大鼠釉质正常牙数和釉质发育不全牙数差异有统计学意义 ($\chi^2 = 50.402, P < 0.05$); 四组之间两两比较, 除外对照组与 5N 力组 ($\chi^2 = 2.105, P = 0.147$)、10N 力

2.4 SEM 观察结果 使用 SEM 观察, 结果显示: 对照组正常釉质表面平整光滑; 实验组釉质变色区表面不平整, 部分呈凹坑状; 釉质缺损区表面粗糙, 部分区域呈剥脱状。见图 7。

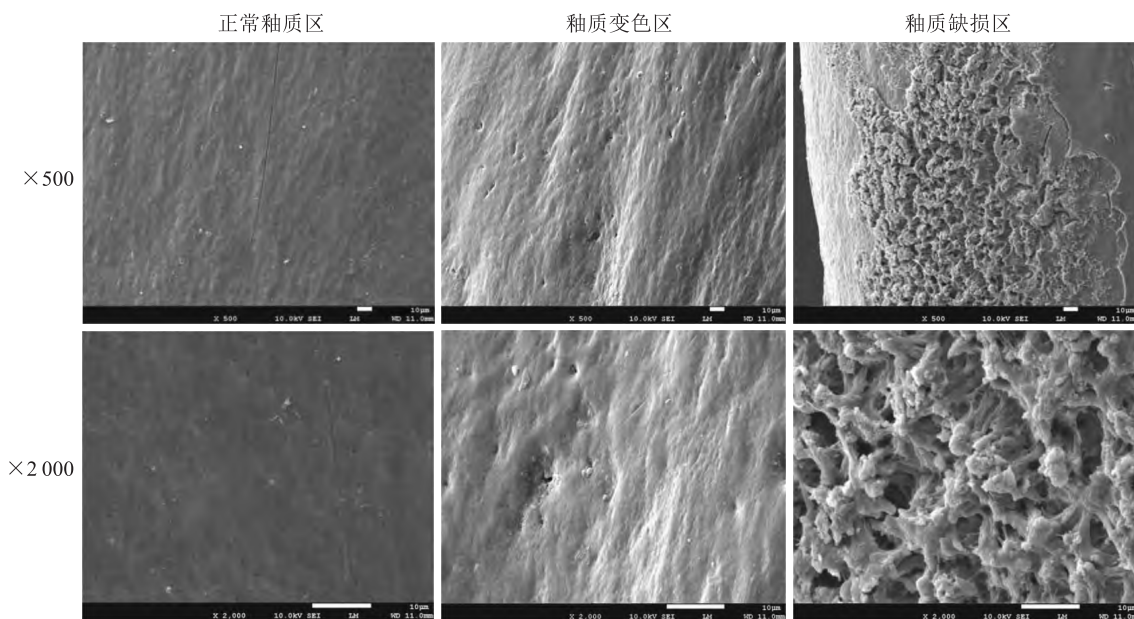


图7 SEM 下的不同釉质区域

2.5 EDS 测量实验组及对照组样本 Ca、P 含量及钙磷比 (Ca/P) 与对照组釉质正常区相比,实验组釉质异常区钙含量较低 ($P < 0.05$),磷含量亦较低 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。钙磷比 ($P = 0.79$) 差异无统计学意义。见表 2。

表 2 外伤牙釉质异常区与对照组釉质正常区 Ca 和 P 的质量分数 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	Ca	P	Ca/P
对照	27.38 ± 0.34	15.04 ± 0.23	1.82 ± 0.14
实验	15.10 ± 10.11	14.92 ± 4.67	1.79 ± 0.36

3 讨论

氟斑牙依据其临床表现分为四种不同类型:釉质变色(I型),釉质异常聚结(II型),部分釉质缺损型(III型),I、II或III组合型(IV型)^[1]。釉质外观上氟斑牙与特纳牙的表现相似,临床上诊断易混淆,常需结合病史才能加以鉴别,从多方面进行区别研究十分重要。关于外伤性特纳牙,有学者通过实验动物建模的方法探讨牙胚外伤造成釉质发育不全的机理,猴和犬因牙齿生理解剖结构与人类相似可作为外伤性特纳牙建模的理想动物模型。Thylstrup et al^[2]曾用猴来建立乳牙外伤模型研究对继承恒牙胚的影响,取得较好效果。本课题组前期也通过挫入犬乳牙研究对继承恒牙胚的影响,结果显示继承恒牙釉质发育不全发生率达到了 85.4%,主要表现为釉质着色和缺损^[3]。文献中未见报道大鼠牙外伤模型;若同时研究氟斑牙与特纳牙的相关区别,大鼠是更为理想的建模动物。啮齿类动物的切牙唇侧釉质与人牙釉质结构类似^[4],其牙釉质结构从内到外大致可分为四层:内层无釉柱结构层、釉柱交错结构层、釉柱平行排列结构层、表面无釉柱结构层^[5-6]。另外,SD 大鼠牙胚发育每个阶段界限明确:出生 1 d 牙胚处于钟状末期,此时牙源性细胞特异性分化和矿化组织开始形成^[7]。出生 2 d 牙胚进入分泌早期,牙釉质及牙本质大量形成^[8]。如果牙胚在分泌期及之前受到外伤,之后的釉质发育就可能会受到影响^[9]。因此,本实验选用 1 d 龄 SD 大鼠建立外伤性特纳牙模型。

赵继刚等^[10]通过以 25 mm² 的接触面对犬暴露恒牙牙胚施加 3 kg 的压力时,出现牙齿颜色的改变。因为 1 d 龄的 SD 大鼠下颌牙槽尚未形成,骨壁较薄,直接在牙槽骨上施力即可传导至牙胚上,影响牙胚发育^[11]。因此,本实验选择在下前牙区沿牙

槽突长轴垂直黏膜施力来进行预实验。在实验前对 SD 大鼠进行施力大小测试,施加 5 N 的力时,小鼠下颌骨受力部位黏膜出现轻微红色压痕;在施加 15 N 的力时,压力头可以穿透下颌黏膜但未穿破牙槽骨;当施加 20 N 时,压力头可轻松穿破黏膜及牙槽骨,术后 SD 大鼠表现痛苦且影响进食,这会对实验建模准确性造成影响故此力值予以舍弃。因此,本研究选取力值大小为 0、5、10、15 N。由于牙胚外伤是由口腔颌面部创伤引起,一般受的力是瞬时力,因此,本实验也选择瞬时力。在弹簧秤刻度的 5、10、15 N 处设置明显标记,在快速施力时,在弹簧秤示数达到所需要的最大力值时即停止施力。本实验中,5 N 力组仅有 2 例出现釉质变色,发生率较低(10%),且未见釉质缺损,不适合建立牙胚外伤模型。通过比较 10 N 力组与 15 N 力组中均出现釉质发育不全(釉质变色和缺损),两组均可以建立外伤性特纳牙模型,但 15 N 力组牙齿未萌数明显高于 10 N 力组。因此,10 N 力更适合建立 SD 大鼠外伤性特纳牙模型。

本实验在扫描电镜下观察到实验组釉质变色区域表面粗糙不平,釉质缺损区釉质孔隙增多,表层釉质结构缺失,裸露内层釉质。这一结果说明了牙胚外伤可明显导致釉质表层结构的改变。而未萌牙的出现则是牙胚外伤所造成更严重的后果,可能是外力使牙胚破损^[12],牙胚死亡停止发育或牙胚发生移位导致了牙齿萌出障碍。本实验中釉质变色主要表现为鼠牙齿表面的白垩色斑块,可能是外伤扰乱了釉质形成的正常程序,导致不正常基质蛋白复合物的形成,过多的釉原蛋白滞留在牙釉质中,改变了釉质的结构,从而改变釉质的光学性质^[13-14]。釉质主要成分是无机物质-羟基磷灰石。钙磷含量一定程度上反应了釉质的矿化程度及再矿化能力^[15]。本研究通过能谱分析显示釉质发育不全区钙磷含量均较正常区域低,推测可能是釉质发育不全区域的釉质出现结构紊乱,部分缺损导致无机物质减少。牙釉质异常区与正常区相比,钙磷比无统计学差异,进一步说明了外伤性特纳牙不同于遗传性釉质发育不全,其对釉质形成的主要影响在于釉质的量而不是釉质的矿化成分。

本实验表明 5 mm² 受力面施加力 10 N 适合建立大鼠外伤性特纳牙模型。通过微观结构分析,外伤性特纳牙釉质的量减少,表面粗糙,凹凸不平,钙磷含量减少。

参考文献

- [1] Lakshman A R, Kanneppady S K, Castelino R L. Turner's tooth with unique radiographic presentation; a case report [J]. *Gen Dent*, 2014, 62(5):52-4.
- [2] Thylstrup A, Andreasen J O. The influence of traumatic intrusion of primary teeth on their permanent successors in monkeys. A macroscopic, polarized light and scanning electron microscopic study [J]. *J Oral Pathol*, 1977, 6(5): 296-306.
- [3] 张彦喜, 吴妍慧, 姚东升, 等. 拔除与保留犬挫人乳牙对继承恒牙影响的实验研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2018, 53(5): 344-50.
- [4] 倪雪岩, 姜秋, 黄洋, 等. 大鼠切牙生长发育的组织学和免疫组织化学研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 2000, 26(6): 586-8.
- [5] Sehic A, Risnes S, Khan Q, et al. Gene expression and dental enamel structure in developing mouse incisor[J]. *Eur J Oral Sci*, 2010, 118(2): 118-30.
- [6] Goldberg M, Kellermann O, Dimitrova-Nakov S, et al. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity[J]. *Front Physiol*, 2014, 5(5):359.
- [7] Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development, how the embryo makes teeth[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 499-508.
- [8] 吕平, 高学军, 贾弘祺, 等. 釉蛋白在大鼠牙胚发育过程中的转录表达[J]. *中华口腔医学杂志*, 2004, 39(5): 66-9.
- [9] Camila S A, Gabriela C A A, Luiz F M M, et al. Frequency of crown and root dilaceration of permanent incisors after dental trauma to their predecessor teeth[J]. *Dent Traumatol*, 2018, 34(6): 401-5.
- [10] 赵继刚, 古向生. 恒牙胚对机械损伤耐受性的实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2013, 29(6): 788-90.
- [11] Soares F C, Cardoso M, Bolan M. Association between trauma to primary incisors and crown alterations in permanent successors [J]. *Braz Dent J*, 2014, 25(4): 332-5.
- [12] 徐鑫, 景皓. 可吸收性根管桩在治疗儿童乳牙外伤以及残冠中的效果[J]. *系统医学*, 2017, 2(9): 119-21.
- [13] Hu J C, Sun X L, Zhang C H, et al. Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars [J]. *Eur J Oral Sci*, 2002, 110(4): 307-15.
- [14] 郑树国, 鲍月琴, 邓辉, 等. 乳牙釉质混浊的偏光特点及其与龋齿易感性的研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2002, 16(3): 195-6, 290.
- [15] Meurman J H, Frank R M. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive in human and bovine enamel [J]. *Caries Res*, 1991, 25(2): 81-7.

Model establishment and microstructure observation of Turner's tooth caused by trauma in SD rat

Gao Li¹, Guo Shan², Li Yibo², Lu Liwen², Zhang Yanxi²

(¹Dept of Pedodontics, ²Dept of Oral Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract Objective To establish an experimental model of Turner's tooth caused by trauma in SD rats and observe its surface by scanning electronic microscopes (SEM) and energy dispersive spectrometry (EDS) was performed. **Methods** 40 SD rats aged one day were randomly divided into four groups ($n = 10$). The control group did nothing, The experimental group was exerted different perpendicular forces (per 5 mm^2) on the mandibular anterior alveolar process, which was divided into 5N force group, 10N force group and 15N force group. The SD rats were killed at 30 days old to observe the enamel development of their mandibular central incisors. Meanwhile, SEM and EDS were used to observe normal enamel area and enamel hypoplasia area. **Results** The control group: all teeth erupted; all enamels developed well. 5N force group: all teeth erupted; the occurrence rate of enamel hypoplasia was 10% (2 teeth had enamel discoloration). 10N force group: 1 tooth unerupted; the occurrence rate of enamel hypoplasia was 80% (12 teeth had enamel discoloration and 4 had enamel defects). 15N force group: 7 teeth unerupted, the occurrence rate of enamel hypoplasia was 60% (3 teeth had enamel discoloration and 9 had enamel defects). There was a statistic difference in the number of unerupted teeth between group 10N force group and 15N force group ($P < 0.05$). Under SEM, cracks and rough appeared on the surface of enamel. EDS showed that the Ca and P content in enamel hypoplasia was lower than that in the normal enamel area ($P < 0.05$). **Conclusion** Tooth trauma can lead to enamel hypoplasia and unerupted teeth. The force of 10 N per 5 mm^2 is better to establish an experimental model of Turner's tooth caused by trauma in SD rats. The surface enamel of Turner's tooth caused by trauma is rough, uneven and the content of calcium and phosphorus decreases.

Key words SD rat; Turner's tooth; trauma; enamel hypoplasia