

牙周病与动脉粥样硬化相关性研究的动物模型

汤旭娜 孙卫斌

1989 年 Mattila 第一次报告,在控制年龄、总胆固醇水平、三酰甘油、高血压、糖尿病和吸烟等因素后,牙周健康状况对冠心病仍有影响。之后学者们进行了大量的流行病学研究,也发现人类牙周感染与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)及相关心脑血管事件的危险增加存在相关。牙周病患者罹患 AS 的比值比(odds ratio, OR)达 2.78。1999 年美国心脏病学会明确提出,AS 是一种炎症性疾病,微生物感染在 AS 发病中起始动作用,但其作用仍未被充分理解。因此,建立一个稳定可靠的动物模型,是研究牙周致病菌与 AS 形成关系的一个关键。本文就已有的模拟在牙周病患者体内的牙周致病菌影响 AS 形成的有效动物模型做一综述。

一、建模的理论基础

目前,关于牙周炎影响 AS 形成和发展有多种假说。例如牙周致病菌可以通过一过性菌血症直接作用于血管系统。牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, PG)是慢性成年人牙周炎病变区,尤其是牙龈指数为 3 的严重炎症部位检出比率最高的革兰阴性厌氧菌。PG 具有很多毒力因子,如红细胞凝集素、胰酶样蛋白酶(牙素素)以及与入侵细胞的能力相关的菌毛。体外研究发现 PG 在有菌毛的情况下,能够侵入并感染上皮细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞,可定植于细胞内,加速血管内皮细胞损伤,并导致血管内皮功能异常。有研究在人类颈动脉和冠状动脉动脉粥样斑块中,通过免疫染色和 PCR 也检测出 PG 的存在^[1-3]。Cavrini 等通过 PCR 和原位杂交在两位患者的 AS 斑块中检测到 PG^[4]。Amar 等通过对比 PG 的野生有菌毛菌株与菌毛缺陷菌株发现,有菌毛的菌株感染的动物模型其粥样斑块面积更大,系统炎症水平也更高^[5]。因此,牙周致病菌直接入侵血管壁可能是 AS 的一个始动因子。

还有的学者认为牙周致病菌在作用于局部牙周组织过程中,会引起局部免疫反应,结果可向血管内

释放细胞因子、趋化因子等,从而引起远隔组织器官或血管内皮细胞的变化。Poult 等向小鼠的皮下气腔内注射 PG,结果在 3h 后小鼠心脏和肺组织有 COX-2 mRNA 的表达^[6]。Gibson 等的研究也在 PG 致牙周炎动物模型中发现,实验动物的主动脉组织有 Toll 样受体表达上升^[7]。这些研究提示牙周致病菌感染可引起固有免疫反应的增强。正是基于这些研究及相关理论,目前有关牙周病与 AS 相关性研究的动物模型主要有两种造模方式,一种是通过口腔接种牙周致病菌造成实验性牙周炎,另一种是通过静脉接种牙周致病菌,然后观察及检测各相关指标,来推断牙周致病菌对 AS 的影响。

二、动物模型

1. 猪:(1)造模方法及结果:①实验性牙龈沟+口内接种 PG+高脂饮食:丁鳌等^[8]使用五指山小型猪,在猪上下颌实验牙颊舌侧分别做翻瓣术,去骨约 3~4mm,形成实验牙龈沟,采用丝线结扎牙颈部并用直径 2mm 正畸钢丝在丝线上加固结扎,使结扎线放入龈沟内。每 20 天将浓度为 1.0×10^6 cfu/ml 的 PG 菌液滴入实验牙龈沟内,并喂饲高脂高胆固醇饮食,3、4 个月分别处死。结果发现 PG 口内接种组均出现牙周袋加深,龈沟出血指数增加。PG 感染联合高脂饮食组的低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇水平在 4 个月时已经有明显高出单纯高脂饮食组的趋势。实验动物病理组织切片显示 PG 联合高脂饮食组比单纯高脂饮食组动脉病变程度更为严重:炎症细胞更多,内膜有剥脱现象,弹力纤维排列紊乱。实验初步证明牙周感染与 AS 具有相关性;②皮下 PG 致敏+静脉接种 PG+普通或高脂饮食:Broda 等人使用猪建模,首先使用热灭活 PG 进行皮下注射使猪致敏,4 周后,进行每周 3 次静脉注射 $1.0 \times (10^6 \sim 10^7)$ cfu/ml PG 进行接种,连续 5 个月,喂饲分普通饮食和高脂饮食^[9]。结果除高脂饮食组 γ -谷氨酰转肽酶(GGTP)稍高于参考值外,其余肝脏有关的酶和肝功能指标均在参考值范围内。各组白细胞间歇性高于参考值。PG 静脉接种组的抗 PG 抗体水平显著升高,但是不

作者单位:210008 南京大学口腔医学院口腔内科

通讯作者:孙卫斌,电子邮箱:wbsun@nju.edu.cn

同菌株 A7436 和 FDC381 间未见明显差异。单纯皮下致敏组抗 PG 抗体水平也升高,但低于静脉接种组。普通饮食组在实验全过程未见血清胆固醇明显变化。高脂饮食组血清胆固醇明显高于基线值,此组中 PG 接种与未接种未见明显差异。普通饮食组中不同菌株静脉接种后,动脉粥样斑的内膜面积间未见显著差异,但显著高于未给菌的对照组。高脂饮食组中的 PG 接种与未接种的动脉粥样斑块面积的差异接近显著性,均高于普通饮食组。此外致敏与未致敏组在主动脉内膜动脉粥样斑面积和内膜斑块平均面积百分比上也未见显著差异。使用 PCR 检测主动脉组织,94% 的 PG 接种组动物显示有 PG 存在,对照组则没有。因此反复的 PG 菌血症可以诱导正常胆固醇血症的冠状动脉和主动脉的粥样硬化改变,对于高胆固醇血症则可以增加其 AS 损害。

(2) 模型特点:猪在解剖学和生理学与人类相似,动脉结构相似,它形成的 AS 与人类相似^[10],孟焕新等采用小型猪也成功建立了实验性牙周炎模型,这说明此类小型猪可以用于研究牙周病与 AS 相关性的研究。实验小型猪有若干确认的品种可供利用,多胎多仔,杂食习性等,其体形大小亦足能供各种外科手术和临床评价之用。另外小型猪有乳牙和恒牙两副牙列,牙的大小与人近似,而且价格相对较便宜。猪模型的缺点是饲养要花一定代价,多数研究中动物模型产生 AS 需要类脂质代谢有一定改变,或动脉受到损伤为基础。但 Brodala 等的研究发现对于猪模型,在正常胆固醇血症条件下进行 PG 接种也会引起颈动脉和冠状动脉形成 AS,这就提示对于猪模型来讲,PG 作为一种致 AS 因素可能是独立于高胆固醇血症之外的,但因此实验样本数量有限,仍无法得到确切的结论。

2. 兔:(1)造模方法及结果:①口内接种 PG + 高脂饮食:Jain 等学者使用新西兰兔进行造模,首先在实验兔双侧下颌第 2 前磨牙进行丝线结扎,然后每周、三、五 3 次使用 1.0×10^9 cfu/ml PG 涂于结扎丝线处,连续 14 周,高脂饮食喂饲^[11]。实验结果发现口腔接种 PG 可以造成牙槽骨吸收,且牙槽骨吸收与动脉粥样斑块面积相关,其中有 2 例虽然进行了口腔接种 PG,但是并未出现牙周病损,同样其主动脉也未出现粥样病变。所有动脉粥样斑块中均未检测到 PG 存在;②单侧髂动脉内皮细胞剥离术 + 静脉接种 PG + 高脂饮食:张明珠等使用新西兰兔进行造模,首先应用 Fogarty 球囊导管进行单侧髂动脉内皮细胞剥离

术,术后 1 周标准菌株 Pg 浓度为 1.0×10^7 cfu/ml,每只经耳静脉接种 100 μ l,每周 1 次,持续 12 周,同时给予或不给予高脂饮食^[12]。12 周后取材,观察兔髂动脉,结果显示兔单侧髂动脉经球囊剥脱术均形成了稳定的内膜增生灶和动脉狭窄。小剂量 PG 静脉注射后,手术侧 AS 改变更加明显,高脂饮食与普通饮食相比,病变似乎也加重。在兔静脉血和动脉斑块上均可检测到 PG 的存在。因此,此实验说明兔髂动脉球囊剥脱术后,给予或不给予高脂饮食,通过小剂量 PG 静脉注射,可建立伴无症状菌血症的兔 AS 模型。(2)特点:兔是最常用以制造高脂症和 AS 模型的实验动物。它对外源性胆固醇吸收率高,对高血脂的清除能力低。只要给予高脂饲料,经 3 ~ 4 个月即可形成明显的 AS。但是,兔为食草动物,脂质代谢与人差异较大。病变主要在胸主动脉,尤其弓部。其冠状动脉病变主要在小动脉,而人主要在冠状动脉大分支。且兔抵抗力差,易继发感染而死亡。

3. 小鼠:(1)造模方法和结果:①口内接种 PG + 高脂饮食:Lalla 等人^[13]使用载脂蛋白 (apolipoprotein E, ApoE) 双基因敲除鼠 ApoE (- / -),在 5 周龄时连续 4 天氨苄西林/卡那霉素灌胃法 (每种药物 2mg/d),便于随后的细菌接种增加细菌定植。6 周龄开始细菌接种,使用人牙周病菌 PG381 株,约 0.2ml 1.5×10^{12} cfu/ml,2% 羧甲基纤维素钠 PBS 液,口腔局部给药和灌肠法连续 3 周共 15 次给药。鼠有食粪习性,所以第 2 种接种方式的原理就是使其粪便带菌,然后进入口腔,这样就建立一个口腔再感染的循环。所有实验鼠在 17 周龄时实行安乐死。实验结果 PG 接种组出现牙槽骨丧失,主动脉粥样斑块损坏面积大于未给菌的对照组,血管炎症程度更高,且血管炎症程度与牙槽骨吸收相关,牙槽骨的吸收程度与主动脉粥样斑块面积正相关;②静脉接种 PG + 普通或高脂饮食:Li 等人^[14]使用 ApoE 单基因敲除鼠,即 ApoE (+ / -),通过尾静脉注射方式用牙龈卟啉单胞菌 PG A7436 感染小鼠,实验组静脉接种 Pg 1.0×10^7 cfu/ml 每只接种 50 μ l,每周 1 次。连续 10 周、14 周及 24 周不等,结果发现 A7436 感染组的 ApoE (+ / -) 小鼠除了牙槽骨破坏严重之外,其主动脉的 AS 病变也比为感染组严重。

(2)特点:ApoE 基因敲除鼠遗传背景清楚,繁殖力强,饲养方便,操作简单和模型稳定,而且血脂水平与人类接近,主动脉和冠状动脉均有明显斑块形成,这为进一步探讨 AS 的发生和发展机制提供良好的

整体动物模型。小鼠模型 ApoE (- / -) 或 (+ / -) 通过口腔和静脉内接种 Pg 侵袭性菌株也可以加速 AS 的形成^[7,13-15]。但是这种模型的缺点在于,只有当小鼠具有高胆固醇血症的条件下,PG 接种才会促进主动脉 AS 的形成,此模型常作为 AS 启动阶段的研究。

另外,口腔接种途径对于确定口腔感染对 AS 的影响是非常必要的,但是不同接种途径对于脉管系统影响的意义至今仍不明确,唯一相同的就是不管接种的途径和方案如何,PG 的持续攻击都能促进 ApoE (- / -) 和 (+ / -) 小鼠 AS 病变的增加。

综上所述,以上实验性的动物模型均得到了牙周病与 AS 具有相关性的结果,这为进一步研究牙周致病菌对于 AS 形成的确切机制提供了实验基础,也为今后临床预防和治疗 AS 提供了新思路。

参考文献

- 1 Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, *et al.* Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 2000, 71 (10):1554 - 1560
- 2 Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*, 1999, 138 (5 Pt2): S534 - S536
- 3 Nakano K, Inaba H, Nomura R, *et al.* Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol*, 2008, 23 (2): 170 - 172
- 4 Cavrini F, Sambri V, Moter A, *et al.* Molecular detection of Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis in carotid and aortic atherosclerotic plaques by FISH: report of two cases. *J Med Microbiol*, 2005, 54 (1): 93 - 96
- 5 Amar Salomon, Wu Shou - chieh, Madan Monika. Is porphyromonas gingivalis cell invasion required for atherogenesis? Pharmacotherapeutic implications. *The Journal of Immunology*, 2009, 182 (3): 1584 - 1592

- 6 Pouliot, M., Clish CB., Petasis NA., *et al.* Lipoxin A (4) analogues inhibit leukocyte recruitment to Porphyromonas gingivalis: a role for cyclooxygenase - 2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*, 2000, 39 (16): 4761 - 4768
- 7 Gibson FC 3rd, Hong C, Chou HH, *et al.* Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E - deficient mice. *Circulation*, 2004, 109 (22): 2801 - 2806
- 8 丁鳌, 王晓燕, 唐昊喆, 等. 小型猪牙周感染与动脉粥样硬化复合模型的建立. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18 (4): 190 - 194
- 9 Brodala Nadine, Merricks Elizabeth P, Bellinger Dwight A, *et al.* Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (7): 1446 - 1451
- 10 Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, *et al.* Diabetes - induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes*, 2001, 50 (7): 1654 - 1665
- 11 Jain A, Batista EL Jr., Serthan C, *et al.* Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (10): 6012 - 6018
- 12 张明珠, 梁景平, 李超伦, 等. 牙龈卟啉单胞菌感染兔动脉粥样硬化模型的建立. *上海交通大学学报*, 2007, 27 (6): 642 - 645
- 13 Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, *et al.* Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E - null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (8): 1405 - 1411
- 14 Li L, Messas E, Batista EL Jr, *et al.* Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E - deficient murine model. *Circulation*, 2002, 105 (7): 861 - 867
- 15 Chi H, Messas E, Levine RA, *et al.* Interleukin - 1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high - fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation*, 2004, 110 (12): 1678 - 1685

(收稿: 2009 - 11 - 30)

(修回: 2009 - 12 - 12)

《国家基本药物临床应用指南》和《国家基本药物处方集》日前印发

20 世纪 70 年代世界卫生组织提出“基本药物”的理念,并据此制定了基本药物示范目录,同时还制定了标准治疗指南和处方集,促进基本药物的公平可及、安全有效、合理使用。《国家基本药物临床应用指南(基层部分)》和《国家基本药物处方集(基层部分)》是根据《国家基本药物目录》2009 版基层部分编写的,主要用于指导和规范基层医务人员合理使用基本药物治疗基层常见病、多发病,也可供其他医疗机构医务人员使用基本药物时参考。《指南》介绍了在疾病诊断明确的前提下,具有处方权的医生应当如何使用基本药物,以便规范医生的用药行为。《指南》基本覆盖了目前基层医疗卫生机构日常诊疗工作中的常见病、多发病。《指南》各类疾病的编写力求简明扼要、科学实用,内容包括概述、诊断要点、药物治疗与注意事项 4 个部分。