

[文章编号 1000-1182(2005)02-0099-04]

基础研究 ·

## 不同 *fimA* 基因型牙龈卟啉单胞菌 在慢性牙周炎患者中的分布

郭永华<sup>1</sup>, 吴亚菲<sup>2</sup>, 刘天佳<sup>2</sup>, 肖晓蓉<sup>1</sup>, 周 斌<sup>3</sup>, 周雪平<sup>3</sup>

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学;

2. 四川大学华西口腔医学院 口腔内科学教研室;

3. 四川大学基础与法医学院 法医物证学教研室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 分析不同 *fimA* 基因型牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 在慢性牙周炎患者中的分布状况。方法 收集 101 例慢性牙周炎患者的龈下菌斑, 采用常规培养法和 16S rRNA PCR 检测 *P. gingivalis*, 并根据各 *fimA* 基因型的特异引物, 用聚合酶链反应 (PCR) 检测不同 *fimA* 基因型菌株的分布。结果 16S rRNA PCR 检测 *P. gingivalis* 阳性检出率为 88.1%。大多数受检牙龈下菌斑中只检测出一种 *fimA* 基因型菌株 (65.1%), 各 *fimA* 基因型的总检出率: *fimA* 为 24.7%; *fimA* 为 43.8%; *fimA* 为 15.7%; *fimA* 为 40.4%; *VfimA* 为 3.4%。结论 慢性牙周炎患者龈下菌斑中的牙龈卟啉单胞菌存在 *fimA* 基因多态性, *fimA* 和 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株与慢性牙周炎的发生发展关系密切。

**[关键词]** 聚合酶链反应; 牙龈卟啉单胞菌; 基因型; *fimA* 基因

**[中图分类号]** R 780.2 **[文献标识码]** A

**The Distribution of *fimA* Genotype of *Porphyromonas gingivalis* in Chronic Periodontitis Patients** GUO Yong-hua<sup>1</sup>, WU Ya-fei<sup>2</sup>, LIU Tian-jia<sup>2</sup>, XIAO Xiao-rong<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>3</sup>, ZHOU Xue-ping<sup>3</sup>. (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Conservative Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Material Evidence, West China College of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract Objective** To investigate the distribution of *fimA* genotype of *P. gingivalis* in chronic periodontitis patients. **Methods** Subgingival plaque samples were collected from 101 chronic periodontitis patients. *P. gingivalis* was detected by both culture method and *P. gingivalis* 16S rRNA PCR. *fimA* type-specific primer were designed, and the distribution of *fimA* genotype of *P. gingivalis* in periodontitis patients were detected by PCR. **Results** The detective ratio of *P. gingivalis* was 88.1%. Among them, a single *fimA* genotype was detected in most subgingival plaque samples (65.1%), and the distribution of five *fimA* genotypes among *P. gingivalis* positive patients was as follows: type , 24.7%; type , 43.8%; type , 15.7%; type , 40.4%; type , 3.4%; respectively. **Conclusion** *P. gingivalis* with various *fimA* genotypes were present in subgingival plaque samples from chronic periodontitis patients, and *P. gingivalis* with type *fimA* and *fimA* were more predominant in chronic periodontitis patients, and they may be associated with the development of periodontitis.

**Key words** polymerase chain reaction; *Porphyromonas gingivalis*; genotype; *fimA* gene

慢性牙周炎是牙周组织的感染性疾病, 常导致牙周组织的破坏和牙槽骨的吸收。牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 是一种革兰阴性的产黑色素厌氧杆菌, 是目前公认的慢性牙周炎的主要致病菌。 *P. gingivalis* 可产生多种毒力因子, 在牙周炎的发生发展过程中起着重要作用。大量研究表明不同 *P. gingivalis* 菌株的致病性存在广泛差异。

Genco 等<sup>1</sup> 在动物实验中证实, 来源于不同牙周炎患者牙周袋内的 *P. gingivalis* 菌株有些能引起动物皮下出现蜂窝组织炎或局部皮肤坏死甚至死亡, 而有些仅引起局限性脓肿形成。

丝状菌毛是 *P. gingivalis* 的主要致病因子, 具有广泛的生物学和免疫学活性, 在 *P. gingivalis* 定植和侵入牙周组织过程中起重要作用<sup>2</sup>。 *fimA* 基因是 *P. gingivalis* 菌毛主要亚基菌毛素 (fimbriin) 的编码基因, 根据 *fimA* 基因开放阅读框架 (open reading frame, ORF) 核苷酸序列的差异, 将 *fimA* 基因分为 5 型( ~ )<sup>3,4</sup>。 Amano 等<sup>5</sup> 最新研究发现 *fimA*

[收稿日期 2004-08-27; 修回日期 2004-10-08]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30471890)

[作者简介] 郭永华 (1977-), 女, 山东人, 博士研究生

[通讯作者] 吴亚菲, Tel: 028-85501471

基因型 *P. gingivalis* 菌株与日本人牙周炎的发展密切相关。目前不同 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 在中国慢性牙周炎患者中的分布情况尚不清楚。本研究采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法检测不同 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株在中国慢性牙周炎患者中的分布,旨在寻找与中国人慢性牙周炎发生发展密切相关的 *fimA* 基因型。

## 1 材料和方法

### 1.1 病例选择

选择就诊于四川大学华西口腔医院牙周科初诊的中国汉族慢性牙周炎患者 101 例为研究对象,女 53 例,年龄 28~70 岁,平均年龄 (52.1 ± 10.2) 岁,男 48 例,年龄 26~80 岁,平均年龄 (50.5 ± 12.5) 岁。慢性牙周炎的诊断采用 Armitage (1999 年) 新分类法<sup>6</sup>,患者的纳入要求为:无全身系统性疾病;3 个月内无牙周病治疗史;无抗菌药物服用史;全口存留牙不少于 16 颗,其中至少有 4 颗磨牙,磨牙中至少有一个位点牙周袋深度大于或等于 4 mm。

### 1.2 龈下菌斑样本的采集

选取患者磨牙牙周袋最深的位点取样,用无菌刮匙去除龈上菌斑,无菌棉球隔湿,干燥,插入两根灭菌纸尖直至牙周袋底,静置 10 s,纸尖取出后立即置于含有 1 ml 厌氧转送液的 EP 管中,送至实验室进行厌氧菌分离培养,剩余标本 - 20 °C 冻存备用。

### 1.3 *P. gingivalis* 常规培养法的鉴定

将 EP 管震荡 30 s,系列稀释,分别取 10 μl 10、100、1 000 倍的稀释液接种于牛心脑浸液 (brain heart immersion, BHI) 培养基 (含 5 % 冻融兔血和 1 % 血晶素),37 °C 厌氧培养 5~7 d。将在 BHI 培养基上生长,产黑色素,吲哚阳性,不发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖、纤维二糖的革兰阴性球杆菌鉴定为 *P. gingivalis*。

### 1.4 *P. gingivalis* 的 16S rRNA PCR 的鉴定和 *fimA* 基因型

1.4.1 模板 DNA 的提取 取出冻存的龈下菌斑样本,100 °C 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

1.4.2 PCR 引物和扩增 PCR 引物序列 *P. gingivalis* 16S rRNA 引物序列参见 Tran 等<sup>7</sup> 的设计, ~ 型 *fimA* 的引物序列参见 Amano 等<sup>8</sup> 的设计。引物序列见表 1 (引物均由成都博瑞克生物技术有限公司合成)。PCR 反应体系 2 μl DNA 模板,上下游引物 (0.01 mmol/L) 各 1.5 μl, 3.75 μl 10 倍稀释的缓冲液, 2.25 μl MgCl<sub>2</sub>, 10 倍稀释的 dNTP (1 mmol/L) 6 μl, 1.5 U TaqDNA 聚合酶 (上海华美生物工程公司提供),用无菌三蒸水补足总体积至 37.5 μl。PCR 参

数 PCR 反应体系:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 56 °C 45 s ( ~ 型 *fimA*:50 °C 45 s),延伸 72 °C 55 s, 36 个循环;延伸 72 °C 7 min。用 6 % 非变性聚丙烯酰胺垂直电泳检测 PCR 扩增产物,用 100 bp marker (Sigma 公司,美国) 确定产物相对分子质量的大小。PCR 对照设置以 *P. gingivalis* 标准菌株 ATCC33277 作为阳性对照 (口腔生物医学工程教育部重点实验室提供),等体积三蒸水作为空白对照。PCR 质控 所有实验样本的测定均在盲法下进行,并随机抽取 10 % 的样本做重复性实验。

表 1 *P. gingivalis* 16S rRNA 和 ~ 型 *fimA* 的引物序列

Tab 1 *fimA* type-specific primer and *P. gingivalis* 16S rRNA primer used in the study

引物	序列 (5'-3')	大小 (bp)
16S rRNA	TGTA GATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCCTC	197
<i>fimA</i>	CTGTGTGTTTATGCACAACTTC AACCCCGCTCCCTGTAATCCGA	392
<i>fimA</i>	ACAAC TACTATGACAATGG AACCCCGCTCCCTGTAATCCGA	257
<i>fimA</i>	ATTACAC TACACAGGTGAGGC AACCCCGCTCCCTGTAATCCGA	247
<i>fimA</i>	CTATTCA GGTGCTATTACCCAA AACCCCGCTCCCTGTAATCCGA	251
<i>fimA</i>	AACAACA GTCCTCTGACAGTG TATTGGGGGTCGAACGTTACTGTC	462

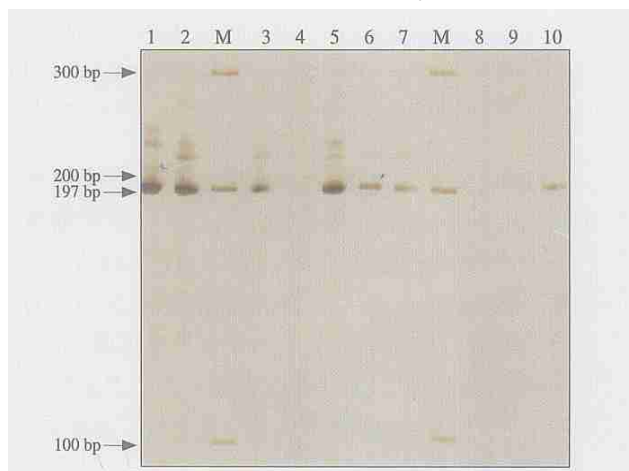
### 1.5 统计分析

用统计分析软件包 SPSS11.0 进行数据处理。用卡方检验比较 PCR 与培养法的检测阳性率及各 *fimA* 基因型的分布,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物电泳结果

16S rRNA PCR 产物电泳结果见图 1,各 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳结果见图 2~6。

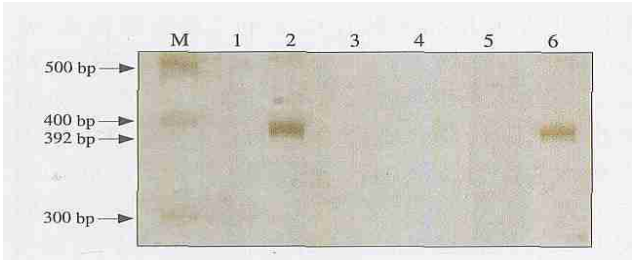


M:marker; 1~3, 5~7, 10: *P. gingivalis* (+); 4, 8, 9: *P. gingivalis* (-)

图 1 *P. gingivalis* 16S rRNA PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingivalis* species-specific 16s rRNA primer

( $P < 0.05$ ) ;其他各组间的差异均无统计学意义。另有 5 个(占 5.6 %)样本 *P. gingivalis* 16S rRNA PCR 结果阳性,而 ~ *fimA* PCR 结果均为阴性。



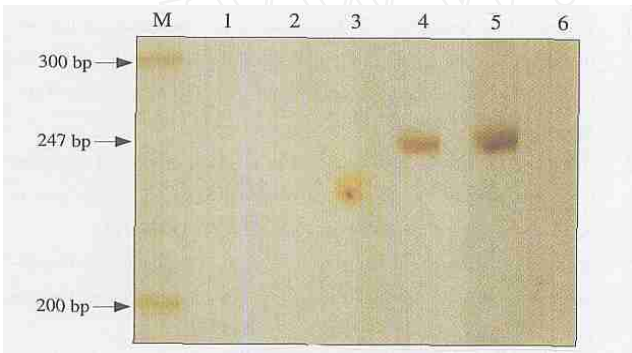
M:marker; 2, 6 : *fimA* (392 bp)  
图 2 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳图

Fig 2 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingi-*  
*valis* *fimA* type-specific primer



M:marker; 1,4,5: *fimA* (257 bp)  
图 3 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳图

Fig 3 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingi-*  
*valis* *fimA* type-specific primer



M:marker; 4,5: *fimA* (247 bp)  
图 4 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳图

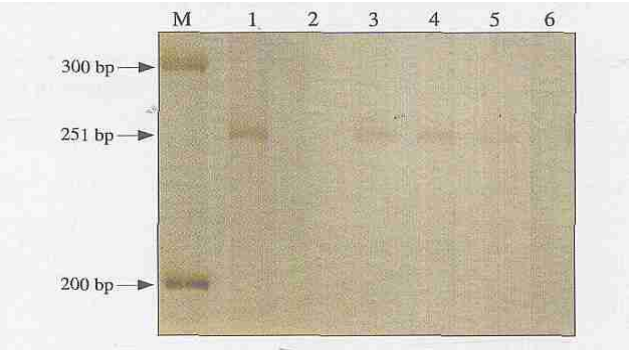
Fig 4 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingi-*  
*valis* *fimA* type-specific prime

2.2 PCR 与培养法 *P. gingivalis* 阳性检出率比较

16S rRNA PCR 与培养法 *P. gingivalis* 阳性检出率的比较见表 2。经卡方检验,PCR 的阳性检出率显著高于培养法( $\chi^2 = 55.793, P < 0.001$ )。

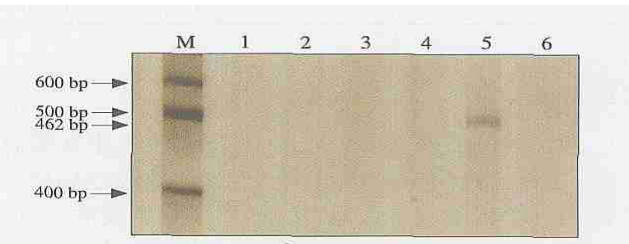
2.3 不同 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株的分布

各 *fimA* 基因型的单独检出率和联合检出率见表 3,4。多数受检牙龈下菌斑只检出一种 *fimA* 基因型菌株(65.1 %),二种和三种 *fimA* 基因型菌株的联合检出率分别为 24.7 %和 4.4 %。从总检出率来看,*fimA* 最高,其次为 *fimA*。*fimA* 和 *fimA* 的检出率明显高于其他各组的检出率,差异有统计学意义



M:marker; 1,3,4,5: *fimA* (251 bp)  
图 5 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳图

Fig 5 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingi-*  
*valis* *fimA* type-specific primer



M:marker; 5: *fimA* (462 bp)  
图 6 *fimA* 基因型 PCR 产物电泳图

Fig 6 Electrophoresis results of PCR production obtained with *P. gingi-*  
*valis* *fimA* type-specific primer

表 2 16S rRNA PCR和培养法 *P. gingivalis* 检测阳性结果的比较

Tab 2 *P. gingivalis* detection results by 16S rRNA PCR and culture methods

分组	阳性(例)	阴性(例)	合计	检出率( % )
培养法	39	62	101	38.6
PCR	89	12	101	88.1

表 3 牙周炎患者 ~ *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 的检出率

Tab 3 Distribution of ~ *fimA* genotype among *P. gingivalis* positive patients

<i>fimA</i> 基因型	单独检出例数( % )	联合检出例数( % )	总检出例数( % )
<i>fimA</i>	3(3.4)	19(21.3)	22(24.7)
<i>fimA</i>	22(24.7)	17(19.1)	39(43.8)
<i>fimA</i>	6(6.7)	8(8.9)	14(15.7)
<i>fimA</i>	25(28.1)	11(12.3)	36(40.4)
<i>fimA</i>	2(2.2)	1(1.1)	3(3.4)
合计	58(65.1)	56(62.7)	

表 4 牙周炎患者各 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 的联合检出率

Tab 4 Co-distribution of various *fimA* genotypes among *P. gingivalis* positive patients

<i>fimA</i> 基因型	检出例数	检出率(%)
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	9	10.1
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	5	5.6
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	1	1.1
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	3	3.4
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	2	2.2
<i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	2	2.2
<i>fimA</i> , <i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	2	2.2
<i>fimA</i> , <i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	1	1.1
<i>fimA</i> , <i>fimA</i> 和 <i>fimA</i>	1	1.1
合计	26	29.2

3 讨论

病因学的研究已经揭示,牙周炎是发生在敏感宿主,由特定致病菌在特定部位引起的感染性疾病。牙龈卟啉单胞菌被认为是慢性牙周炎最主要的致病菌,由于 *P. gingivalis* 属专性厌氧菌,营养要求条件高,故采用常规培养法,分离鉴定 *P. gingivalis* 费时费事,且检出率较低。本研究将 PCR 检测方法 with 常规培养法相比较,发现 PCR 的检出率显著高于常规培养法,且 PCR 方法特异性高,敏感性好,可以用于临床快速检测 *P. gingivalis*。

丝状菌毛是 *P. gingivalis* 重要的毒力因子。Dickson 等<sup>9</sup> 克隆出 *P. gingivalis* 381 菌毛蛋白的编码基因 *fimA*。Loos 等<sup>10</sup> 用 PCR-RFLP 技术扩增 *fimA* 1 044~1 083 片段,分析 39 株不同来源的 *P. gingivalis*,发现 *fimA* 基因分为 9 组 4 型,提示不同 *P. gingivalis* 菌株 *fimA* 基因中存在广泛的异质性,而遗传异质性的变化又是细菌致病性差异的基础。Fujiwara 等<sup>3</sup> 根据 *fimA* ORF 核苷酸序列的差异,将 *fimA* 基因分为 4 型( ~ )。Nakagawa 等<sup>4</sup> 又发现一种新的 *fimA* 基因型( *fimA* )。Amano 等<sup>8</sup> 运用 PCR 技术检测了 380 例日本牙周健康成人和 139 例牙周炎患者 *fimA* 基因型的分布频率,发现 *fimA* 与牙周炎的发生发展密切相关,而 *fimA* 则与健康的牙周状态相关。这一结果说明根据 *fimA* 基因的遗传多态性, *P. gingivalis* 可以分成疾病相关性菌株和疾病不相关性菌株。

本研究调查了 101 例中国汉族慢性牙周炎患者

龈下菌斑中不同 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株的分布状况,发现 *fimA* 和 *fimA* 的总检出率较高,分别为 43.8 %和 40.4 %,显著高于其他 *fimA* 基因型的检出率,这一结果与 Amano 等<sup>8</sup> 的研究结果相似,表明 *fimA* 和 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株与中国人慢性牙周炎的发生发展密切相关,但是 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株在中国牙周炎患者的检出率略高于日本患者,这可能与入种、生活习惯、地区差异有关。本研究结果表明,慢性牙周炎患者龈下菌斑中的 *P. gingivalis* 菌株存在 *fimA* 基因多态性,推测特异的 *fimA* 基因型可能与中国人群慢性牙周炎的发生发展关系密切。本研究发现 *fimA* 和 *fimA* 基因型 *P. gingivalis* 菌株与慢性牙周炎的发生发展密切相关。此外,本研究在 5 个患者的龈下菌斑中还发现了按现有 *fimA* 分型未能定型的 *P. gingivalis* 菌株,是否存在新的 *fimA* 基因型尚有待于进一步的研究。

[参考文献]

1 ] Genco CA, Cutler CW, Kapecajnski D, et al. A novel mouse model to study the virulence of host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* J. Infect Immun, 1991, 59(4):1255-1263.

2 ] Hamada S, Amano A, Kimura S, et al. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria J. Oral Microbiol Immun, 1998, 13(3):129-138.

3 ] Fujiwara T, I Nakagawa, S Morishima, et al. Inconsistance between the fimbrillin gene and the antigenicity of lipopolysaccharides in selected strains of *Porphyromonas gingivalis* J. FEMS Microbiol Lett, 1994, 124(3):333-342.

4 ] Nakagawa I, Amano A, Richard K, et al. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene J. J Clin Microbiol, 2000, 38(5):1909-1914.

5 ] Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients J. J Clin Microbiol, 1999, 37(5):1426-1430.

6 ] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases conditions J. Ann Periodontol, 1999, 4(1):1-6.

7 ] Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and specific-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* J. J Clin Microbiol, 1996, 34(11):2674-2678.

8 ] Amano A, Kubonwa M, Nakagawa I, et al. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status J. J Dent Res, 2000, 79(9):1664-1668.

9 ] Dickson DP, Kubinjec MA, Genco RJ, et al. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis* J. J Bacteriol, 1988, 170(9):1658-1665.

10 ] Loos BG, Dyer DW, Whittam TS, et al. Genetic structure of population of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections J. Infect Immun, 1993, 61(1):204-212.