

临床研究 ·

3 种寡核苷酸探针对龈下菌斑中牙周致病菌的检测

张贤华 张 斌 吴织芬

【摘要】 目的 采用寡核苷酸探针研究龈下菌斑中 3 种牙周致病菌的分布。**方法** 利用 3 种寡核苷酸探针检测 60 例慢性牙周炎患者 60 个患病位点、10 例健康人的 10 个健康对照位点龈下菌斑中的牙龈卟啉单胞菌、福赛类杆菌、牙密螺旋体进行检测。**结果** 牙周炎位点龈下菌斑中的牙龈卟啉单胞菌、福赛类杆菌、牙密螺旋体的检出率分别为 91.67%、90.00% 和 95.67%，明显高于健康对照位点；有 83.33% 的牙周炎位点同时检出 3 种致病菌，3 种细菌检出情况为两两正相关 ($P < 0.01$)。**结论** 牙龈卟啉单胞菌、福赛类杆菌、牙密螺旋体在慢性牙周炎患者龈下菌斑中的检出率很高，它们间可能存在相互协同致病作用。

【关键词】 牙周炎； 牙龈卟啉单胞菌； 福赛类杆菌； 牙密螺旋体； 寡核苷酸探针

Distribution of 3 Kinds of Periodontal Pathogens in Subgingival Plaques of Patients with Chronic Periodontitis

ZHANG Xianhua*, ZHANG Bin, WU Zhifen. (* Department of Periodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To observe the prevalence of *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) and *Bacteroides forsythus* (Bf) subgingivally in diseased sites of chronic periodontitis (CP) patients. **Methods** Samples of subgingival plaque were detected by 3 kinds of oligonucleotide DNA probe from 60 sites of CP patients and 10 healthy sites of 10 healthy people. **Results** The positive rates of Pg, Bf and Td in patients were 91.67%, 90.00% and 95.67% respectively; Pg, Bf and Td were detected simultaneously in 83.33% patients and Pg, Bf and Td were found to be related with each other ($P < 0.01$). **Conclusion** Pg, Bf and Td were prominent periodontopathic bacteria and related each other, might exist in complexes in subgingival plaque and coagregate together.

【Key words】 periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; *Treponema denticola*; *Bacteroides forsythus*; oligonucleotide DNA probe

研究表明口腔微生物在牙周病的发生、发展中起有重要作用。目前口腔微生物的检测已被用于预测牙周病的进展和评价牙周病的治疗效果。本研究使用 3 种公认牙周病致病菌的寡核苷酸探针对慢性牙周炎患者龈下菌斑中的牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg)、福赛类杆菌 (*Bacteroides forsythus*, Bf)、牙密螺旋体 (*Treponema denticola*, Td) 进行检测,探讨这 3 种病原菌的分布及其致病机理。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择 1994 年 6 月 ~ 1995 年 12 月在第四军医大学口腔医院牙周科初诊诊断为慢性牙周炎的患者 60 例为研究实验组。

作者单位: 610041 四川大学华西口腔医院牙周科(张贤华), 第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室(张 斌), 第四军医大学口腔医院牙周科(吴织芬)

其中男 28 例,女 32 例,年龄 24 ~ 65 岁,平均年龄 42.3 岁。牙周组织健康者 10 例为对照组,其中男 6 例,女 4 例,年龄 24 ~ 28 岁,平均年龄 26 岁。所有受试者均无系统性疾病,近 3 个月未接受过牙周治疗及未曾服用过抗生素,女性为非妊娠、非月经期。

1.2 取样位点的选择

60 例慢性牙周炎患者,每人选择 1 个患病位点取样,共选择 60 个受检位点。选择标准:探诊深度(probing depth, PD) 6 mm、附着丧失(attachment loss, AL) 6 mm。10 位健康对照者各选 1 个位点取样,共选择 10 个健康取样位点。

1.3 细菌的取样与寡核苷酸 DNA 探针检测

去除龈上菌斑,擦干取样位点,隔湿,将 1 根无菌纸捻插入牙周袋最深处 30 s,采取龈下菌斑样本。将采样后的纸捻储存在装有 100 μ l 稳定缓冲液的试管中(含有 4 mol/L 的硫氰酸胍和 2-巯基乙醇),70 $^{\circ}$ C 加热 10 min,离心冻存直至斑点杂交分析。

将样本点样放置于多管吸印仪的尼龙膜上,利用合成的 32 P 标记的 Pg、Bf、Td 的寡核苷酸 DNA 探针 (Pg、Bf 探针来自

美国 Microprobe Bothell Wa 公司, *Td* 探针来自 IAI 公司)对尼龙膜上的小亚单位核糖体 RNA (small subunit ribosomal RNA, ssrRNA) 进行斑点杂交,洗脱打点后通过 Trace-96 系统 (Inotech 公司) 直接计数。最初得到的结果是细菌的 ssrRNA 数,通过换算得到细菌数。细菌的检测范围为 $2 \times 10^4 \sim 6 \times 10^8$,在计数后进行膜的自动摄影。

1.4 临床指标的测量

每颗取样位点牙检测如下临床指标: 牙龈指数 (GI) 和菌斑指数 (PLI) 测量标准均参照 Loe 和 Silness (1963 年) 的标准, 探诊深度 (PD), 附着丧失 (AL)。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,慢性牙周炎组和健康对照组细菌检出率的比较采用 χ^2 检验,细菌间相关分析采用 Spearman 相关分析。

2 结 果

2.1 慢性牙周炎组和健康对照组取样位点的临床指标

慢性牙周炎组和健康对照组取样位点临床指标的测定结果,见表 1。

表 1 取样位点的临床指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Clinical parameters of sampling sites ($\bar{x} \pm s$)

分组	位点数	探诊深度	附着丧失	牙龈指数	菌斑指数
健康对照组	10	1.80 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
慢性牙周炎组	60	7.40 ± 1.31	8.37 ± 1.75	2.50 ± 0.57	2.20 ± 0.73

2.2 寡核苷酸探针检测结果

寡核苷酸探针检测表明 *Pg*、*Bf*、*Td* 在慢性牙周炎患者中的检出率很高,分别为 91.67%, 90.00% 和 95.67%, 明显高于健康对照组的 10.00%、40.00% 和 10.00%, 两组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。另外,牙周炎患者 3 种致病菌的同时检出率为 83.33%, 健康对照组没有同时检出 3 种致病菌者,见表 2。

表 2 *Pg*、*Td*、*Bf* 在龈下菌斑中的检出情况 (个)

Tab 2 Frequency of 3 periodontal pathogens in subgingival plaques

分组	取样位点	<i>Pg</i> (+)	<i>Bf</i> (+)	<i>Td</i> (+)	<i>Bf</i> , <i>Pg</i> , <i>Td</i> (+)
健康对照组	10	1 (10.00%)	4 (40.00%)	1 (10.00%)	0
慢性牙周炎组	60	55 ** (91.67%)	54 ** (90.00%)	58 ** (95.67%)	50 ** (83.33%)

** 与健康组比较 $P < 0.01$

2.3 慢性牙周炎患者龈下菌斑中 *Pg*、*Bf*、*Td* 相关性

Pg、*Bf*、*Td* 3 种细菌在慢性牙周炎患者中的检出率较高,对 3 种细菌相关性的研究发现, *Pg*、*Bf*、*Td*

两两正相关 (*Bf*-*Pg* $r = 0.8951$, $P < 0.01$; *Bf*-*Td* $r = 0.6571$, $P < 0.01$; *Pg*-*Td* $r = 0.4956$, $P < 0.01$)。表明这 3 种细菌在很多牙周炎位点同时存在,特别是深牙周袋和进展性位点可能存在龈下微生物的复合体,彼此之间具有协同生长作用。

3 讨 论

目前研究表明牙周病的发生、发展与牙周袋内特异革兰氏阴性厌氧菌的积聚密切相关,其中类杆菌群和螺旋体起重要作用。Bragd 等¹ 认为牙周病的活动性和一些关键牙周致病菌的存在有关,这些致病菌包括 *Pg*、*Bf*、*Td*、伴放线放线杆菌等。Socransky 等² 研究表明,探诊出血的活动性破坏区, *Pg*、*Bf*、*Td* 的比例明显增加;而 Papapanou 等³ 发现 *Pg*、*Bf*、*Td* 的存在使牙周附着丧失的危险度增加,表明特异致病菌和临床指标具有一定的相关性。故学者们认为临床上识别这些特异致病菌有利于早期诊断和制定治疗计划。

本研究使用的探针是合成的寡核苷酸探针,是与 *Pg*、*Bf*、*Td* 3 种公认牙周致病菌 ssrRNA 互补的寡核苷酸 DNA 片段,通过斑点杂交检测慢性牙周炎患者龈下菌斑中的细菌分布。细菌染色体内有多个拷贝形式 ssrRNA, ssrRNA 集保守性和变异性为一身,不同的科、属、种间都有不同的差异。1987 年, Woese⁴ 预见 ssrRNA 将成为细菌分类和计数的奠基石。现在可利用的原核生物序列有 4 000 多种,许多为全长,一旦选定合适的寡核苷酸肽段,就可在几千种细菌中检测出某种细菌。目前 ssrRNA 已被广泛的用于细菌的分类和鉴定。DNA 探针检测和鉴定细菌与常规细菌学鉴定方法比较,不需要厌氧培养的特殊设备,省时,省力,快速,同时排除了厌氧菌不易存活的假阴性。Savitt 等⁵ 同时使用细菌培养和 DNA 探针两种方法检测 *Pg* 和其它牙周致病菌,发现 DNA 探针较传统的细菌培养方法更为准确,为临床医生提供了更敏感和方便的方法检测牙周病原菌。

本研究用寡核苷酸探针发现, *Pg*、*Bf*、*Td* 在牙周炎患者中的检出率很高,说明它们是中重度慢性牙周炎发生、发展中的优势菌群。另外,本研究表明慢性牙周炎患者有 83.33% 的位点同时检出 *Pg*、*Bf*、*Td* 3 种致病菌,且 3 种细菌两两正相关。Socransky 等⁶ 利用聚类分析研究表明,龈下菌斑中存在 5 个紧密相关的微生物复合体,其中包括 *Pg*、*Bf*、*Td* 3 种细菌的复合体,此复合体和牙周袋深度、探诊出血等临床指标

(下转第 310 页)

迅速的倾斜移动不利于牙周组织的改建,但临床医生可以采取的措施来积极地控制有害倾斜,使其尽量平行移动或整体移动,向拔牙创内置入羟基磷灰石就是有效措施之一。实验表明羟基磷灰石的置入不会阻碍牙齿的移动,且可对抗拔牙创的缩窄;同时在牙根和羟基磷灰石之间出现纤维结缔组织,并在结缔组织中出现暂时性骨再生,以便包围着牙齿,减少牙周附着的丧失。因此,可在拔牙后立即移动牙齿,以缩短治疗时间。这与本研究结果相似,说明拔牙后应尽早开始向拔牙区移动牙齿,这样可以充分利用拔牙创的牙槽骨改建优势,加快牙齿移动;但在移动过程中,应注意控制移动方式,加强支抗。

参考文献

- 1 Hiseh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth movement in the rats. Arch Oral Biol, 1994, 39(5): 425-428

- 2 King G, Keeling SD, McCoy EA, et al. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1991, 99(5): 456-465
- 3 Tran Van P, Vigner A, Baron R. Cellular kinetics of the alveolar bone remodeling sequence in the rats. Anat Rec, 1982, 202(4): 445-451
- 4 Yamasaki K. The role of cystic AMP, calcium and prostaglandins in bone resorption associated with experimental tooth movement. J Dent Res, 1983, 62(8): 877-881
- 5 Hasler R, Schmid G, Ingervall B, et al. A clinical comparison of the rate of maxillary canine retraction into healed and recent extraction sites—A pilot study. Eur J Orthodont, 1997, 19(6): 711-719
- 6 Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. Braz Dent J, 1997, 8(1): 9-12
- 7 Tokuhito Y. Usefulness of the bodily movement of the tooth into the hydroxyapatite-packed extracted cavity. Gifu Shika Gakkai Zasshi, 1989, 16(2): 485-499

(2002-03-15 收稿, 2003-04-17 修回)

(本文编辑 刘 怡)

(上接第 288 页)

密切相关。Gmur 等⁷ 研究也表明 *Pg*、*Bf* 具有很强的相关性, Pederson 等⁸ 也证实 *Pg*、*Td* 间具有相关性。

Umeda 等⁹ 研究表明, 在深牙周袋和活动性位点, 可发现 *Pg*、*Bf*、*Td* 同时存在。Kigure 等¹⁰ 用免疫组化技术对龈下菌斑活检标本研究表明, 龈下菌斑、上皮组织中同时存在 *Pg*、*Td*, 其中在 4~6 mm 牙周袋内, 电镜标本发现 *Td* 位于菌斑的表层, 而 *Pg* 位于菌斑表层下。Yao 等¹¹ 研究表明这 3 种细菌在体外存在相互协同作用。这些结果和本研究结果均表明牙周炎患者龈下菌斑中可能存在 *Pg*、*Bf*、*Td* 微生物复合体, 彼此间相互协同作用, 在慢性牙周炎的发生、发展中起重要作用。

(感谢日本新时代株氏会社 Mr. Toru Eguchi 和 Mr. Yōzan Taniguchi 给予的大力支持!)

参考文献

- 1 Bragd L, Dahlen G, Wikstrom N, et al. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis: A retrospective study. J Clin Periodontol, 1987, 14(2): 95-99
- 2 Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol, 1998, 25(2): 134-144
- 3 Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: Prevalence and relation to periodontal disease progression. J Periodontol, 1997, 68(7): 651-666

- 4 Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev, 1987, 51(2): 221-271
- 5 Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, et al. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. J Periodontol, 1988, 59(7): 431-438
- 6 Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol, 1998, 25(2): 134-144
- 7 Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. J Periodont Res, 1989, 24(2): 113-120
- 8 Pederson ED, Miller JW, Matheson S, et al. Trypsin-like activity levels of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* in adults with periodontitis. J Clin Periodontol, 1994, 21(8): 519-525
- 9 Umeda M, Tominaga Y, He T, et al. Microbial flora in the acute phase of periodontitis and the effect of local administration of minocycline. J Periodontol, 1996, 67(4): 422-427
- 10 Kigure T, Saito A, Seida K, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. J Periodont Res, 1995, 30(5): 332-341
- 11 Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, et al. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. Oral Micro Immun, 1996, 11(1): 35-44

(2001-12-31 收稿, 2003-02-10 修回)

(本文编辑 邓本姿)