

老年人根面菌斑内氏放线菌临床分离株 基因型多样性分析

郭斌^{1,2} 杨帆³ 贾岳¹ 夏茜¹ 周学东¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室,四川大学,四川 成都 610041;

2.解放军总医院 口腔医学研究所,北京 100853; 3.昆明市口腔医院 牙体牙髓病科,云南 昆明 650000)

[摘要] 目的 分析老年人根面菌斑中内氏放线菌临床株的基因型多样性,探讨内氏放线菌基因型与根面龋的关系。方法 选择老年根面龋患者20例设为根面龋组,无根面龋老年人20例设为无龋组。根面龋组以暴露的无龋根面和根面龋损部位为取样位点,无龋组以暴露的根面为取样位点,刮取菌斑进行临床株的分离鉴定,并利用基因外重复回文序列聚合酶链反应(REP-PCR)分析内氏放线菌基因型的多样性。结果 2组共分离出内氏放线菌299株,选择156株进行REP-PCR分析,分离出61个不同的基因型。根面龋组无龋根面分离的57株内氏放线菌有25个基因型,根面龋损部位分离的34株有25个基因型,无龋组分离的65株有26个基因型:内氏放线菌基因型存在多样性。单个取样位点的基因型数目存在差异($P<0.05$)。结论 多种基因型的内氏放线菌参与了根面龋的发生。

[关键词] 内氏放线菌; 根面龋; 基因型; 基因外重复回文序列聚合酶链反应

[中图分类号] R 781.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.019

The genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* of root caries in aged people GUO Bin^{1,2}, YANG Fan³, JIA Yue¹, XIA Qian¹, ZHOU Xue-dong¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Institute of Stomatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 3. Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, Kunming Dental Hospital, Kunming 650000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* in aged people and the relationship between the genotypes of *Actinomyces naeslundii* and root caries. **Methods** According to the inclusion criteria, 20 aged people with root caries and 20 without root caries were chosen into two groups for this study. Two sites were chosen in subjects with root caries: One site was the exposed sound root surface, and the other site was the root caries. In subjects without root caries the sampling site of root surface was exposed. Bacteria were cultured and then identified. Repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction (REP-PCR) was used to analyze the genotypic diversity of the *Actinomyces naeslundii* clinic isolates. **Results** 299 strains were isolated from the groups, 156 strains were chosen to analyze, belonged to 61 different genotypes. At the site of sound root surface in the subjects with root caries, there were 57 strains with 25 different patterns. At the site of root caries and of sound root surface in subjects without caries, there were 34 strains with 25 different patterns and 65 strains with 26 different patterns respectively. There was the genotypic diversity within *Actinomyces naeslundii*. There was significant difference in the genotypes in every individual site. **Conclusion** Many different genotypes of *Actinomyces naeslundii* concerned with occurrence of root caries.

[Key words] *Actinomyces naeslundii*; root caries; genotype; repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction

根面龋是老年人的口腔常见疾病之一。目前认

为,内氏放线菌是根面菌斑的主要优势菌,与根面龋的发生发展密切相关。近年来,多数学者^[1]认为根面龋的发生是由多种基因型的内氏放线菌相互作用的结果,但是,不同程度根面龋损的内氏放线菌的基因型及其分布特点,以及是否存在致病优势基因型尚存争议,需行进一步研究。基因外重复回文

[收稿日期] 2009-12-10; [修回日期] 2010-03-20

[基金项目] 四川省科技支撑计划基金资助项目(2006Z09-040); 四川省重点科技攻关基金资助项目(2007SGY024)

[作者简介] 郭斌(1968—),女,四川人,主任医师,博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501439

序列聚合酶链反应(repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction, REP-PCR)鉴别能力高且操作简便,是研究生物基因型多样性较好的方法。

本研究采用REP-PCR技术研究老年根面龋患者的内氏放线菌基因型的种类及分布,分析该菌与老年人根面龋之间的关系,为防治老年人根面龋提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象的选择

在四川大学华西口腔医院特诊科就诊的老年人中随机选择根面龋患者及无根面龋者各20例为研究对象,分别设为根面龋组和无龋组。根面龋组要求:1)年龄为60岁及以上;2)患有根面龋;3)涉及取样的牙无牙髓及未控制的牙周病变;4)最近1个月未服用抗菌药物。无龋组要求:1)年龄为60岁及以上;2)无根面龋,龋失补牙数(decay missing filling tooth, DMFT)小于4;3)涉及取样的牙无牙髓及未控制的牙周病变;4)最近1个月未服用抗菌药物。试验前向研究对象及其陪同人员说明试验目的及过程,并签署知情同意书。

1.2 材料和器械

内氏放线菌标准株ATCC 12104(由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供);蛋白酶K(ARMESCO公司,美国),溶菌酶(上海生物工程技术服务有限公司),*Taq* DNA聚合酶,25 mmol·L⁻¹ MgCl₂溶液(北京博大泰克生物基因技术有限责任公司),dNTP(Promega公司,美国);Gradient PCR Thermal Cycle仪(Eppendorf公司,德国),凝胶成像系统(Gel Doc 1000型,BIO-RAD公司,美国),Micro Centaur台式小型高速离心机(Sanyo公司,日本),低速台式离心机(TDZ4-WS型,长沙湘仪离心机仪器有限公司),D2000 DNA Ladder(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 取样位点

根面龋组每位受检者选择2个菌斑取样位点,其中A点为暴露的无龋根面,B点为根面龋的龋坏部位;无龋组每位受检者选择1个菌斑取样位点(C点),即暴露的根面。

1.4 内氏放线菌的分离培养和分型

在取样位点处刮取根面菌斑,用螺旋接种仪接种,经BHI培养、分离和生化鉴定,鉴定为内氏放线菌。根面龋组A取样位点共分离出内氏放线菌110株(A组),B取样位点共分离出内氏放线菌64株(B组);无龋组共分离出内氏放线菌125株(C组)。从

分离的299株内氏放线菌中,采用单纯随机抽样的方法选择156株行REP-PCR分析,其中A组57株,B组34株,C组65株。随机抽样的具体方法是将所有受检者的临床分离株随机编号,选择单号菌株进行试验。

1.5 REP-PCR方法

1.5.1 细菌DNA的提取 取50 mg菌斑标本于1 mL生理盐水中充分混匀,3 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清液。加入25 g·L⁻¹溶菌酶溶液,孵育90 min后,3 000 r·min⁻¹离心10 min,弃去上清液,再加入500 μL的STE缓冲液,混匀后依次加入50 μL 10%十二烷基硫酸钠和10 μL 20 g·L⁻¹蛋白酶K,37℃孵育5 h以上,然后分别加入500 μL的Tris饱和酚和200 μL氯仿,取上层黏稠水相,最后加入30 μL 3 mol·L⁻¹的NaAc及2.5倍体积的预冷无水乙醇,混匀后取絮状DNA,洗涤、沉淀后溶解DNA,于-20℃保存备用。

1.5.2 REP-PCR的引物设计和反应体系 REP-PCR的引物设计参考Paddick等^[2]的研究。引物序列如下:REP1-RDt:5'-IIHNCGNCGNCATCNGCC-3';REP2-Dt:5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'。REP-PCR反应体系包括10×Buffer 3 μL, MgCl₂ 3 μL, dNTP 0.36 μL, REP1-RDt 1 μL, REP2-Dt 1 μL, *Taq* DNA聚合酶0.3 μL, ddH₂O 19.34 μL, cDNA 2 μL,终体积为30 μL。

1.5.3 REP-PCR和琼脂糖凝胶电泳 在Gradient PCR Thermal Cycle仪上行REP-PCR扩增,反应完成后,取REP-PCR反应产物5 μL进行琼脂糖凝胶电泳(电压100 V,时间30 min)。电泳后采用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察电泳条带并记录DNA指纹图谱。每次REP-PCR均设对照组,空白对照不含DNA模板,阳性对照为内氏放线菌标准株ATCC 12104。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。内氏放线菌基因型与根面龋的相关关系采用四格表的Fisher确切概率法检验,3组中单个位点基因型数目的比较采用单因素方差分析,检验水准为双例α=0.05。

2 结果

经REP-PCR反应,156株内氏放线菌共分离出61个不同的基因型,A组57株分离出25个,B组34株分离出25个,C组65株分离出26个(见图1、2、3)。经Fisher确切概率法检验,在根面龋组的无龋根面和龋坏部位,以及无龋组根面分布的内氏放线菌各

基因型的种类无明显差异($P>0.05$),未发现与根面龋敏感性相关的特异基因型。

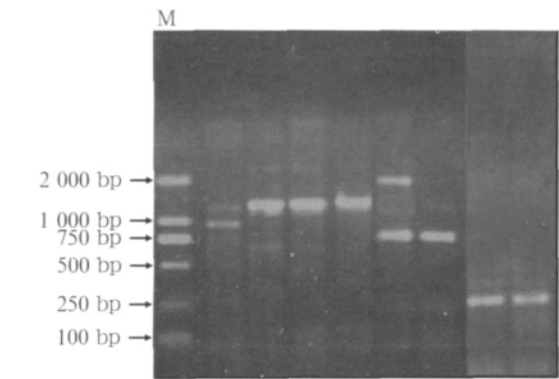


图 1 A组19号受检者内氏放线菌临床分离株REP-PCR基因型
Fig 1 REP-PCR patterns of *Actinomyces naeslundii* separated from No. 19 in group A

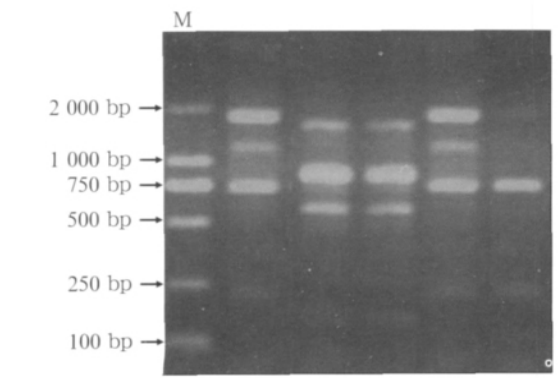


图 2 B组19号受检者内氏放线菌临床分离株REP-PCR基因型
Fig 2 REP-PCR patterns of *Actinomyces naeslundii* separated from No. 19 in group B

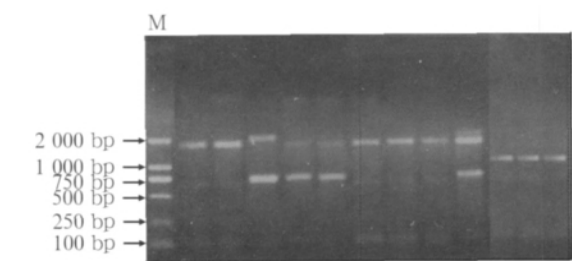


图 3 C组13号受检者内氏放线菌临床分离株REP-PCR基因型
Fig 3 REP-PCR patterns of *Actinomyces naeslundii* separated from No. 13 in group C

单个取样位点内氏放线菌基因型的分布情况见表1。A组20个取样位点,平均每个位点检测得基因型(1.70 ± 1.84)种,B、C组平均每个位点检测得基因型分别为(1.40 ± 1.57)种和(1.95 ± 1.75)种。经方差分析,3组单个取样位点测得的基因型数目的差异有统计学意义($P<0.05$),C组最多,A组次之,B组最少。

表 1 单个取样位点内氏放线菌基因型种类的数目
Tab 1 The amounts of genotypes of *Actinomyces naeslundii* in a single sampling site $n=20$

基因型种类数	取样位点		
	A	B	C
0	6	7	5
1	4	7	4
2	7	1	4
3	0	2	2
4	1	2	3
5	1	1	2
6	0	0	0
7	1	0	0

3 讨论

Morelli等^[3]报道,感染性疾病患者中存在特异性基因型的细菌,其对感染起主导作用。Haubek等^[4]鉴定了1个伴放线菌嗜血菌的特异性基因型克隆,其产物能增加细胞毒性。目前将口腔菌群的特异性基因型和表现型特征相联系的研究还相对较少。有学者^[2]采用REP-PCR技术分析前牙邻面内氏放线菌的遗传多样性,结果发现龋活跃组内氏放线菌所占比例较无龋组低,但菌株基因的多样性无明显差异,在1个受试者检出的最多的基因型可达21个。Bowden等^[1]从釉质表面、无龋根面及软龋根面取样,分离得到972株内氏放线菌,检测得到54种不同的基因型,但未发现优势基因型。

本研究采用REP-PCR技术分析根面菌斑内氏放线菌的基因型,156株细菌共获得61个不同的REP-PCR带型,3组的内氏放线菌都显示了明显的基因型多样性,但未发现与根面龋发生有明显相关关系的优势基因型,这与Bowden等^[1]的研究结果一致。

本研究还发现:老年根面龋患者的无龋根面和龋坏根面,以及无根面龋老年人根面的内氏放线菌基因型整体检出量无明显差异,但无龋组单个位点检出的基因型最多,根面龋组无龋根面检出的基因型次之,龋坏根面最少,说明根面龋损部位单个位点的内氏放线菌基因型数目低于无龋根面,推测与龋损部位生态环境的变化引起细菌的演替有关。这种基因型数目的变化和根面龋易感性的关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Bowden GH, Nolette N, Ryding H, et al. The diversity and distribution of the predominant ribotypes of *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in samples from enamel and from healthy

于表面隆起部分的边缘,悬空生长。这提示,成骨细胞在光滑和粗糙钛片表面附着形式和细胞形态有很大差异,并且,正是由于这种差异,导致细胞在受力后的形态变化也存在很大差异。作为光滑表面的PT组,细胞在材料表面的附着不甚牢固,故受力后胞体容易被拉长,沿流体方向转向,这种变化能够减少细胞对流体的阻力,对细胞本身而言也意味着受到流体更小的冲击,反映了细胞对切应力的适应性变化。而作为粗糙表面的SB组和SB-AB组,细胞附着牢固,因此,在受到外力时,细胞可以顺势伸出细长的突触贴附在孔洞周围,以对抗流体力,或者伸出众多的突触附着于表面孔隙,将体积变大,增加与材料的附着,以对抗流体力的冲击。SB-AB组虽然与SB组表面粗糙度接近,但是由于形成了大量微米级窝洞,更利于细胞的贴附,所以完全没有表现出沿切应力方向的转向。这也提示相同粗糙度的表面,不同粗糙形式对成骨细胞的影响也不同。有学者通过体外细胞培养发现,改良喷砂形成的钛表面微结构更能刺激周围组织反应活性,成骨细胞在其表面具有很强的黏附、分化和增殖潜能,能够形成垂直性的骨愈合。另外应力环境下骨组织改建具有方向性,这种方向性是否也与细胞取向有关还不得而知。

[参考文献]

- [1] Anselme K, Bigerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion[J]. J Mater Sci Mater Med, 2006, 17(5) :471-479.
- [2] Soboyejo WO, Nemetski B, Allameh S, et al. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 62(1) :56-72.
- [3] Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, et al. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure[J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(3) :258-264.
- [4] Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, et al. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression[J]. Clin Oral Implants Res, 2005, 16(6) :650-656.

- [5] Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Tissue engineering of bone: Effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type collagen matrices[J]. Biomaterials, 2005, 26(3) :311-318.
- [6] Knothe Tate ML, Niederer P, Knothe U. *In vivo* tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading[J]. Bone, 1998, 22(2) :107-117.
- [7] Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, et al. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes—a cytoskeleton-dependent process[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 225(1) :62-68.
- [8] Johnson DL, McAllister TN, Frangos JA. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts[J]. Am J Physiol, 1996, 271(1 Pt 1) :E205-E208.
- [9] Williams JL, Iannotti JP, Ham A, et al. Effects of fluid shear stress on bone cells[J]. Biorheology, 1994, 31(2) :163-170.
- [10] Hochmuth RM, Mohandas N, Blackshear PL Jr. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique[J]. Biophys J, 1973, 13(8) :747-762.
- [11] Levesque MJ, Nerem RM. The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture[J]. Biorheology, 1989, 26(2) :345-357.
- [12] 吴丹, 丁寅, 王琪, 等. 流体剪切力对大鼠成骨细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23(4) :197-199.
WU Dan, DING Yin, WANG Qi, et al. Effects of fluid shear stress on the proliferation and cell cycle of rat osteoblasts *in vitro*[J]. J Clin Stomatol, 2007, 23(4) :197-199.
- [13] Sterck JG, Klein-Nulend J, Lips P, et al. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress *in vitro*[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt 1) :E1113-E1120.
- [14] Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, et al. Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2000, 15(5) :675-690.
- [15] Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, et al. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2002, 17(3) :377-383.
- [16] Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, et al. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(4) :421-429.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第 648 页)

- and carious root surfaces of teeth[J]. J Dent Res, 1999, 78(12) :1800-1809.
- [2] Paddock JS, Brailsford SR, Kidd EA, et al. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5) :2467-2472.
- [3] Morelli G, Malorny B, Müller K, et al. Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic

spread[J]. Mol Microbiol, 1997, 25(6) :1047-1064.

- [4] Haubek D, Dirienzo JM, Tinoco EM, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12) :3037-3042.

(本文编辑 胡兴戎)