

[文章编号] 1000-1182(2010)05-0535-04

## 再治疗根管内粪肠球菌检出 及其与临床表征关系的分析研究

牛卫东<sup>1</sup> 宋其义<sup>1,2</sup> 王丽娜<sup>1,2</sup> 郑建博<sup>1,2</sup> 史春<sup>1</sup> 李继遥<sup>3</sup> 周学东<sup>3</sup>

(1.大连医科大学口腔医学院 口腔内科学教研室,辽宁 大连 116044;

2.口腔疾病研究国家重点实验室,四川大学; 3.四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科,四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 检测临床再治疗根管内的粪肠球菌,分析粪肠球菌检出率与临床症状及体征之间的关系。方法 临床收集需根管再治疗的患牙108颗,记录症状和体征,根管内采集细菌样本,提取细菌基因组DNA,用聚合酶链反应定性检测粪肠球菌。结果 根管内粪肠球菌的检出率为47.2%。在有症状病例、有体征病例、既有症状又有体征病例中,根管内粪肠球菌的检出率分别为52.6%、57.9%、62.5%,其中,有体征病例与无体征病例粪肠球菌的检出率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),既有症状又有体征病例与无体征病例组粪肠球菌的检出率差异有统计学意义( $P<0.05$ );在有症状的病例组中,有咬合痛的病例粪肠球菌的检出率为66.7%,与无咬合痛病例组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 再治疗根管内粪肠球菌的存在与临床症状或体征密切相关。

**[关键词]** 粪肠球菌; 再治疗根管; 临床症状体征

**[中图分类号]** R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.021

**Analysis of relationship between the detection of *Enterococcus faecalis* in post-treatment endodontic disease and clinical symptom or sign** NIU Wei-dong<sup>1</sup>, SONG Qi-yi<sup>1,2</sup>, WANG Li-na<sup>1,2</sup>, ZHENG Jian-bo<sup>1,2</sup>, SHI Chun<sup>1</sup>, LI Ji-yao<sup>3</sup>, ZHOU Xue-dong<sup>3</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) in post-treatment endodontic disease, and to analyze the relationship between the occurrence of *E. faecalis* and clinical symptom. **Methods** 108 teeth which need root canal retreatment were collected, and the clinical symptoms and physical signs were recorded. Bacterium samples from root canal were taken, and genome DNA from bacterial samples were extracted. The occurrence of *E. faecalis* by means of the polymerase chain reaction was investigated. **Results** The detection rate of *E. faecalis* in cases of root canal retreatment was 47.2%, while in cases with symptoms or signs, or cases with both symptoms and signs, the root canal *E. faecalis* detection rates were 52.6%, 57.9%, 62.5%. The detection rates of *E. faecalis* between cases with clinical symptom and without clinical symptom demonstrated statistical significance ( $P<0.05$ ). The detection rates between cases with both clinical symptom and manifestly aneretic root and cases without clinical symptom and manifestly aneretic root had statistical significance ( $P<0.05$ ). In the group of clinical symptom, the detection rate of *E. faecalis* in cases with biting pain was 66.7%, clearly higher than those without biting pain ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** The occurrence of *E. faecalis* in cases of root canal retreatment correlates with clinical symptoms.

**[Key words]** *Enterococcus faecalis*; root canal retreatment; clinical symptom and physical sign

牙髓根尖周病是人类口腔最常见的牙齿细菌感染性疾病,随着诊疗技术的不断进步,根管治疗的

成功率已明显提高。尽管如此,失败的病例仍有发生,其中微生物因素是主要原因。已经证实根管治疗后再感染是多种细菌混合感染,其中,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)是近年来研究和关注的热点,是难治性和继发性根管感染中最常分离到的细菌种类,检出率可达77%<sup>[1]</sup>,而在未经治疗的感染根管中,粪肠球菌检出率仅为7.5%<sup>[2]</sup>。聚合

[收稿日期] 2009-09-20; [修回日期] 2010-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30870670);大连市科技局科技计划基金资助项目(2008E13SF205)

[作者简介] 牛卫东(1967—),女,辽宁人,教授,博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501480

酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种体外DNA扩增技术,由于其操作简便、快速特异、灵敏度高等特点<sup>[3]</sup>,已广泛用于临床微生物检测与诊断。

在我国,对根管内粪肠球菌检出率的报道少见,而国外相关研究报道亦少见。本实验利用PCR技术检测临床根管治疗失败后再感染根管内的粪肠球菌,旨在分析粪肠球菌的检出率与临床症状及体征之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象及分组

选自2009年1—6月华西口腔医院牙体牙髓科就诊的根管再治疗的患者,患者距初次根管治疗时间平均2.5年,共108颗患牙为研究对象,男性45例和女性63例,年龄段介于14~76岁。所有患者在近3个月内未服用过抗生素,无系统病史,阅读知情同意后同意参与研究。记录临床患者的具体情况:姓名、性别、年龄、牙位、病史、症状体征(包括自发痛、咬合痛、叩痛、牙龈脓肿及瘘道)、影像学特征(根尖周是否有暗影,包括首次治疗后未愈合且渐进性增大或新出现的暗影)等。收集的病例按症状及X线表现分为3组:A组症状包括自发痛、咬合痛;B组体征包括触痛、叩痛、牙龈脓肿及瘘道,牙周膜增宽,根尖暗影;C组既有症状又有体征者(符合A组及B组条件)。

### 1.2 临床样本采集

依据病例选择标准选取患牙,患牙抛光清洁后,用3%过氧化氢消毒患牙及周围2 cm直径范围各30 s,安置橡皮障。去除冠修复体、桩核、腐质等,用根管锉去除根管内充填物,参照X线影像的根管总长度,以距离根尖区2~3 mm为下端止点,将25号H锉置入根管内连续3次,以中等力度在一侧根管侧壁上反复3次提拉,锉取根管壁牙本质,连续3次。将刮取物放入一盛有1 mL TE缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH7.6)缓冲液的无菌1.5 mL EP管中。无菌纸尖封入根管60 s后,取出,去除暴露在根管以外的部分,放入盛有1 mL TE缓冲液中,连续3次。如有干燥根管,可先在根管内注射少量的无菌生理盐水,以保证样本的采集能有效的进行。每一个样本在2 h内进行彻底震荡,-20℃保存备用<sup>[4]</sup>。取样的根管长度的确定和临床症状均由同一位牙体牙髓专业医生检测和记录。

### 1.3 再治疗根管内粪肠球菌的检测

1.3.1 标准菌悬液制备 取粪肠球菌标准株(ATCC 29212)的牛奶保存液50 μL,接种于普通琼脂固体培养基上,恒温培养箱37℃培养24 h进行细菌复苏。

挑取部分菌落革兰染色后观察菌落形态,无菌接种环挑取经鉴定的纯培养单个粪肠球菌菌落,置于含2 mL BA液体培养基的康氏管中进行24 h增菌,用磷酸盐缓冲液配制密度为 $1 \times 10^9$  CFU·mL<sup>-1</sup>的粪肠球菌悬液1 mL,-20℃冷冻备用,为阳性对照组。

1.3.2 细菌基因组DNA的提取 将粪肠球菌标准菌株悬液及样本于37℃融化10 min,并充分震荡,取300 μL移入另一灭菌1.5 mL EP管中。按照细菌基因组快速提取试剂盒(上海捷瑞生物有限公司)的使用说明进行DNA提取。提取结果5 μL用1%琼脂糖凝胶进行电泳,检测细菌基因组DNA的提取结果。

1.3.3 引物的设计与合成 根据GenBank中粪肠球菌基因组中16S rRNA的保守序列,参考Sedgley等<sup>[4]</sup>文献,设计引物,序列为:上游引物5'-CCGAGTG-CTTGCACTCAATTGG-3';下游引物5'-CTCTTATG-CCATGCGGCATAAAC-3'。预期扩增的片段长度为138 bp。使用前参照说明书用纯水稀释成10 μmol·L<sup>-1</sup>,分装成每管100 μL备用。

1.3.4 PCR反应 以提取的粪肠球菌标准株及样本中的细菌基因组DNA为模板,使用Eppendorf PCR扩增仪(Eppendorf公司,德国)进行PCR扩增,25 μL反应系统为:5 μL DNA模板、1 μmol·L<sup>-1</sup>上下游引物各0.5 μL、12.5 μL Taq酶混合,加入无菌双蒸水至25 μL。PCR反应的参数:预变性95℃ 5 min,变性95℃ 30 s,退火62.1℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,35个循环;循环结束后于72℃延伸7 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,用标准参考物确定产物相对分子质量的大小,电泳结束后将凝胶置于凝胶成像分析系统(BioRad公司,美国)中进行分析。结果判定,相对于阳性对照组,在138 bp出现特异性条带为阳性,否则为阴性。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,利用四格表 $\chi^2$ 检验进行组内比较,分析不同症状及体征的病例中粪肠球菌的检出情况。

## 2 结果

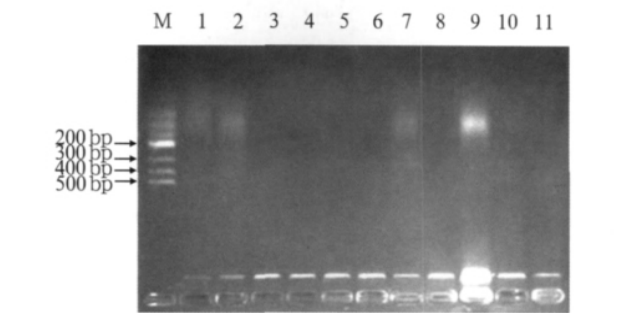
### 2.1 细菌基因组DNA的提取

电泳结果显示(图1),与阳性对照组相同,所有样本的提取物均出现扩增产物,细菌提取的DNA纯度达到抽提要求。提示所收集的再治疗根管内样本中均有细菌存在,排除了假阴性的可能。

### 2.2 PCR检测结果

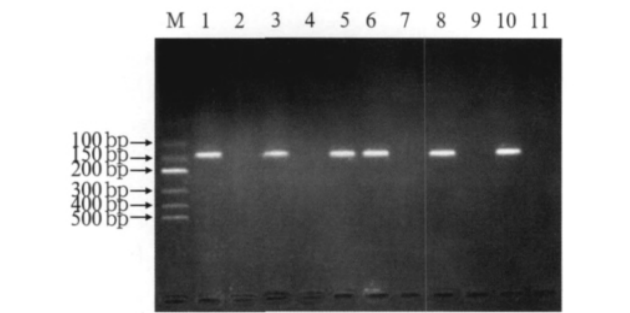
2%琼脂糖凝胶电泳结果显示(图2),3、5、6、8、10组与阳性对照组相同,设计的引物均能有效扩增样本的粪肠球菌目的基因片段,且扩增特异性高,

目的条带在138 bp，该5组根管内粪肠球菌检出结果为阳性。与阴性对照组相同，2、4、7、9、11组粪肠球菌检出结果为阴性。



M: DNA相对分子质量标准; 1: 阳性对照组粪肠球菌标准株; 2~11: 再治疗根管内样本。

图 1 再治疗根管内细菌基因组DNA提取电泳结果  
Fig 1 Electrophoresis of bacterial genomic DNA from the cases of root canal retreatment



M: DNA相对分子质量标准; 1: 阳性对照组粪肠球菌标准株; 2: 阴性对照组PBS缓冲液; 3、5、6、8、10: *E. faecalis*检出阳性; 2、4、7、9、11: *E. faecalis*检出阴性。

图 2 再治疗根管内*E. faecalis* PCR扩增产物的电泳结果  
Fig 2 PCR profiles of *E. faecalis* from the cases of root canal retreatment

将收集的108例样本按不同的临床症状或体征进行统计，PCR对粪肠球菌的检出情况如表1所示。

表 1 不同临床症状与体征的再治疗根管内粪肠球菌检出率

Tab 1 Detection rate of <i>E. faecalis</i> from the cases of root canal retreatment of different clinical symptoms and signs				
组别	病例数	粪肠球菌 检出例数	粪肠球菌 检出率/%	P值
自发痛	16	9	56.3	0.433
咬合痛	21	14	66.7	0.047
叩痛	45	20	44.4	0.625
牙龈脓肿	7	4	57.1	0.587
瘻道	6	5	83.3	0.068
2年内新出现暗影	52	20	38.5	0.079
2年内暗影增大	8	5	62.5	0.250

按不同组别分类粪肠球菌的检出率如表2所示。临床需根管再治疗的病例中，根管内粪肠球菌的检

出率为47.2%。四格表 $\chi^2$ 检验结果显示，在临床症状中咬合痛的病例组中粪肠球菌的检出率高于无咬合痛的病例组( $\chi^2=3.96, P<0.05$ )，有根尖周破坏与无根尖周破坏的病例中粪肠球菌的检出率有显著性差异( $\chi^2=5.56, P<0.05$ )，在既有临床症状又有根尖周暗影的病例中粪肠球菌的检出率高于无症状无暗影的病例( $\chi^2=8.39, P<0.05$ )。表明粪肠球菌的检出与临床症状中的咬合痛密切相关，与根尖周破坏呈正相关。

表 2 不同标准分类的各组中再治疗根管内粪肠球菌检出率

Tab 2 Rate of <i>E. faecalis</i> from cases of root canal retreatment of different groups				
组别	病例数	粪肠球菌 检出例数	粪肠球菌 检出率/%	P值
A组	57	30	52.6	0.234
B组	57	33	57.9	0.019
C组	32	20	62.5	0.004

注：A组示有临床症状的患者；B组示有体征的患者；C组示既有症状又有体征的患者。

### 3 讨论

粪肠球菌在再治疗病例中检出率高的原因可能为在治疗过程中被带入根管，操作区隔离不全、暂封材料微漏、开放引流等可造成粪肠球菌的初始感染<sup>[5]</sup>，亦可能因为粪肠球菌耐受低氧、强碱性及营养匮乏的根管微环境后形成单一感染所致。经过化学机械性预备后的根管系统中仍存在活的粪肠球菌，且再感染根管内的检出率最高，可能由于粪肠球菌能够渗透到根管的分叉区、不规则区，不受常规预备和根管内药物的影响，定植于牙本质小管中再次感染根管。

与以往的研究不同，本实验针对不同的临床症状或体征对粪肠球菌的检出情况进行了统计分析，108例再治疗根管的临床样本中，疼痛的病例主要为咬合痛及叩痛，57例有明显的根尖周破坏。而在所有的临床症状中，有瘻道的病例中粪肠球菌的检出率高达83.3%，但与无瘻道的病例无统计学差异，这可能与在所收集的病例中有瘻道的病例过少有关。为了进一步分析粪肠球菌的检出与临床症状或根尖周破坏的关系，将收集的病例按照症状及X线表现进行分类，研究结果显示，粪肠球菌在所有再治疗根管内的检出率为47.2%，在有症状的根尖周有明显破坏的病例中，检出率高达62.5%，与Gomes等<sup>[6]</sup>报道基本一致。在无症状的根尖周明显破坏的病例中粪肠球菌的检出率为57.9%，与Siqueira等<sup>[1]</sup>检出



率高达77%有一定区别,这可能由于其病例较少有关,仅有22例。

统计学分析结果显示,有临床症状与无临床症状的粪肠球菌检出率无统计学差异( $P>0.05$ ),但在咬合痛与非咬合痛的病例中粪肠球菌的检出率有显著性差异( $P>0.05$ ),提示粪肠球菌可能是导致咬合痛的主要病原菌。有临床症状且有根尖周明显破坏的病例较无临床症状无根尖周破坏的病例粪肠球菌检出率高( $P<0.05$ ),有根尖周破坏的病例与无根尖周破坏的病例中粪肠球菌的检出率存在显著性差异( $P<0.05$ )。表明再治疗根管内粪肠球菌的检出率与根尖周破坏呈正相关,而在根尖周破坏的情况下,有症状的病例较无症状的病例粪肠球菌检出率高。Kayaoglu等<sup>[7]</sup>研究发现,粪肠球菌定植于根管系统,引起牙髓根尖周病的主要毒力因子有聚集物质、肠球菌表面蛋白、肠球菌胶原蛋白黏附素、脂磷壁酸、透明质酸酶及溶细胞素等。透明质酸酶能够降低体内透明质酸的活性,升高组织液的渗透能力,导致细胞肿胀坏死,这可能与粪肠球菌引起的根尖周组织的咬合痛有关。溶细胞素能抑制细胞的自我修复,促使局部恶化,损害细胞膜,这可能导致了根尖周病变不愈合或产生新的根尖周病变。

PCR技术能够应用于细菌检测的关键是核糖体RNA,是所有生物中最保守的大分子物质<sup>[8-9]</sup>,本实验针对粪肠球菌16S rRNA的保守区域设计特异的寡核苷酸引物,对其进行特异的扩增,进而达到鉴别粪肠球菌的目的。PCR能识别复杂根管环境中死菌或者有活力但是无法用培养法培养出的粪肠球菌所释放的DNA<sup>[10]</sup>,对粪肠球菌检测的精确度明显大于传统的微生物培养法,确保了实验的准确性。

## [参考文献]

- [1] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004, 97(1) : 85-94.
- [2] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, et al. *Actinomyces species*, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections[J]. J Endod, 2002, 28(3) : 168-172.
- [3] Siqueira JF Jr. Endodontic infections : Concepts, paradigms, and perspectives [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002, 94(3) : 281-293.
- [4] Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus spp* [J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(1) : 10-19.
- [5] Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation[J]. Int Endod J, 1997, 30(2) : 91-95.
- [6] Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(2) : 247-253.
- [7] Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* : Relationship to endodontic disease[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2004, 15(5) : 308-320.
- [8] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2) : 221-271.
- [9] Tanner A, Maiden MF, Paster BJ, et al. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria [J]. Periodontol 2000, 1994, 5 : 26-51.
- [10] Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC, et al. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5) : 1953-1959.
- [11] Foroodi F, Duivenvoorden WC, Singh G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells [J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(2) : 115-122.
- [12] 刘斌, 吴军正, 孙安, 等. PTEN基因转染对黏液表皮样癌细胞M<sub>3</sub>SP<sub>2</sub>增殖的抑制作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5) : 361-363.
- [13] LIU Bin, WU Jun-zheng, SUN An, et al. Transfection of the exogenous PTEN inducing growth inhibition of the mucoepidermoid carcinoma cell line M<sub>3</sub>SP<sub>2</sub> *in vitro* [J]. West China J Stomatol, 2002, 20(5) : 361-363.
- [14] Martin-Fernandez C, Bales J, Hodgkinson C, et al. Blocking phosphoinositide 3-kinase activity in colorectal cancer cells reduces proliferation but does not increase apoptosis alone or in combination with cytotoxic drugs[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(6) : 955-965.

(本文编辑 汤亚玲)

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第534页)

2009, 47(7) : 1667-1675.

- [8] Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity[J]. Int J Oncol, 2005, 26(4) : 1017-1023.
- [9] 郭欣, 陈春悠, 黎洁. 端粒酶逆转录酶在涎腺恶性肿瘤中的表达[J]. 中国综合临床, 2006, 22(11) : 1033-1035.
- [10] GUO Xin, CHEN Chun-you, LI Jie. Expression of human telomerase reverse transcriptase in carcinoma of salivary gland[J]. Clin Med Chin, 2006, 22(11) : 1033-1035.
- [11] Son K, Fujioka S, Iida T, et al. Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10) : 3995-4003.
- [12] Foroodi F, Duivenvoorden WC, Singh G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma