

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0648-04

牙龈卟啉单胞菌PG0717基因与慢性牙周炎的相关性研究

刘静波¹, 林莉¹, 李琛², 俞宁¹, 潘亚萍¹

(1.中国医科大学口腔医院 牙周科; 2.中国医科大学口腔医学院 中心实验室, 辽宁 沈阳 110002)

[摘要] 目的 检测慢性牙周炎患者和牙周健康者龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)PG0717基因, 探讨PG0717基因与牙周临床指数之间的关系。方法 选取慢性牙周炎(CP)患者90例和牙周健康者90例, 共采集龈下菌斑标本540个; 记录临床牙周指数(牙周探诊深度、临床附着丧失和探诊出血); 设计特异性引物检测*P.gingivalis*阳性龈下菌斑标本的PG0717基因。结果 在*P.gingivalis*阳性龈下菌斑中, CP组PG0717基因检出率显著高于对照组, 分别为56.22%和41.27%($\chi^2=4.50$, $P<0.05$); 随着牙周探诊深度、临床附着丧失加重和探诊出血趋势的增加, CP组该基因检出率呈现增高趋势。结论 PG0717基因与*P.gingivalis*的致病性有关。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; PG0717基因; 脂蛋白; 慢性牙周炎

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A

Relationship of *Porphyromonas gingivalis* PG0717 gene with chronic periodontitis LIU Jing-bo¹, LIN Li¹, LI Chen², YU Ning¹, PAN Ya-ping¹. (1. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Central Laboratory, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

[Abstract] **Objective** The aim of the present study was to investigate PG0717 gene of *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) in subgingival plaque of the chronic periodontitis patients and periodontal healthy subjects, and to find out the relationship of detection rate of PG0717 and periodontal clinical parameters. **Methods** A total of 540 subgingival plaque samples were collected from 180 subjects including chronic periodontitis(CP) patients($n=90$) and periodontal healthy individuals($n=90$). The periodontal clinical parameters including probing depth(PD), clinical attachment loss(CAL), and bleeding on probing(BOP) were estimated by Florida probe. The extracted DNA samples of *P.gingivalis* positive was amplified with the sequence specific primers designed to obtain the PG0717 gene. **Results** In subgingival plaque of *P.gingivalis* positive, the detection rate of PG0717 in CP group was significantly higher than that in periodontal healthy subjects(56.22% versus 41.27%, $\chi^2=4.50$, $P<0.05$). The detection rate of PG0717 in CP group showed the increasing tendency in accordance with the depth of PD and CAL. A higher detection rate of PG0717 was observed in the sites of BOP positive than that in BOP negative(57.73% versus 14.29%, $\chi^2=42.01$, $P<0.01$). **Conclusion** The findings suggest that the PG0717 gene may influence the virulence of *P.gingivalis*.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; PG0717 gene; lipoprotein; chronic periodontitis

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*) 在牙周炎的细菌病因学研究中被认为是重要的牙周可疑致病菌之一, 与牙周炎症的发生、发展和复发密切相关。PG0717基因(AE015924)全长 1 104 bp, 编码脂蛋白(lipoprotein, LP); 脂蛋白能

够诱导促炎细胞因子产生, 影响细菌的定植和生存, 侵袭和破坏组织并且破坏宿主的免疫防御机制^[1]。本研究通过研究PG0717基因的分布, 旨在发现该基因与牙周状态之间的关系, 从而为*P.gingivalis*致病机制的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器和实验菌株

溶菌酶(北京夏新生物制剂有限公司), 蛋白酶K(Merck公司, 德国), *Taq*酶(大连宝生物工程有限

[收稿日期] 2008-01-28; [修回日期] 2008-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772427); 辽宁省教育厅科学技术研究基金资助项目(20061021)

[作者简介] 刘静波(1980-), 女, 辽宁人, 博士

[通讯作者] 潘亚萍, Tel: 024-22891701

公司),引物(北京三博远志生物技术有限公司),PCR扩增仪(TGRADIENT, Biometra公司,德国),自动凝胶成像分析仪(GDS8000, UVP公司,美国)。

本研究采用了3种国际参考标准株:牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277、牙龈卟啉单胞菌W83和变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans*)ATCC 2517。除牙龈卟啉单胞菌W83由美国佛罗里达大学牙科学院口腔微生物研究所惠赠外,其余由首都医科大学口腔医院提供。

1.2 受试对象

慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)组:选取2005年2月—2006年11月在中国医科大学口腔医院牙周科就诊的90例慢性牙周炎患者,年龄在19~68岁,男32例,女58例,平均(41.47±12.95)岁。纳入标准:根据牙周病新分类系统^[2]诊断慢性牙周炎患者;知情同意,口内义齿(包括固定义齿和活动义齿)小于8个牙位者。排除标准:近3个月内接受过牙周治疗及服用过抗生素者,有全身系统性疾病者,有吸烟史者。

对照组:选择牙周健康者90例,年龄在19~66岁,男33例,女57例,平均(40.20±12.43)岁。纳入标准:口内义齿(包括固定义齿和活动义齿)小于8个牙位者;全口余牙牙周探诊深度(probing depth, PD)均小于3 mm,临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL)均小于1 mm,无牙龈红肿,所有位点探诊出血(bleeding on probing, BOP)为阴性;知情同意。排除标准同病例组。

1.3 牙周检查

使用Florida电子牙周探针(FP32, Florida Probe公司,美国)检测受试者受检牙位的PD、CAL,记录BOP情况。对参加牙周检查的医生进行一致性检验^[3]:PD检测一致性≥95%,CAL检测一致性≥89%,BOP检测一致性≥99%。

1.4 龈下菌斑采集

每位患者采集3个受试位点的龈下菌斑:2个牙周袋最深位点,1个相对健康的位点。对照组取右上象限21、24、26颊侧近中位点。去除受试牙的龈上菌斑,棉卷隔湿。用无菌牙签取适量龈下菌斑,保存于装有1 mL PBS缓冲液的EP管中,-70℃保存。

1.5 DNA提取

常规酚氯仿法提取菌斑标本DNA。

1.6 *P.gingivalis*的检测

本实验应用*P.gingivalis* 16S rDNA特异性引物序列为:上游5'-TGTAGATGACTGATGGTGAAAA-CC-3',下游5'-ACGTCATCCACACCTTCCTC-3',

预期产物片段为197 bp^[4]。

PCR反应体系为25 μL:10×Buffer缓冲液2.5 μL, dNTP 2.0 μL(2.5 mmol/L), *Taq* DNA聚合酶0.15 μL(5 U/L),上下游引物各0.5 μL(12.5 pmol/μL),细菌DNA模板2 μL,超纯水17.35 μL。反应条件为预变性94℃ 5 min,变性94℃ 45 s,退火58℃ 45 s,延伸72℃ 1 min,35个循环,延伸72℃ 10 min。分别以牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277、变异链球菌ATCC 2517和等体积的无菌去离子水作为PCR反应的阳性、阴性和空白对照。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,在预期片段处出现条带为阳性,无条带为阴性。

1.7 PG0717基因的检测

据PG0717基因序列(GeneBank No: AE015924),使用Primer 5.0软件设计引物,BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)对引物进行同源性分析。PG0717引物序列为:上游5'-TCCGCCTTGTAT-GTGCCG-3',下游5'-ATCGCTTCCAACCTATCCTAA-TG-3',预期扩增片段497 bp。

PCR反应条件为95℃预变性5 min,95℃变性30 s,56.6℃退火1 min,72℃延伸30 s,进行35个循环后,72℃延伸10 min。分别以牙龈卟啉单胞菌W83、牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277和等体积无菌去离子水作为反应的阳性、阴性和空白对照。PCR反应体系、结果检测和判定同上。

1.8 质控

所有实验样本的测定均在盲法下进行,并使用随机数字表法随机抽取10%的样本做重复性实验,检测PCR结果的可靠性。

1.9 统计学分析

应用SPSS 11.0统计软件进行统计分析。以位点作为统计对象,采用四格表的卡方检验对不同牙周状态下细菌或基因的检出率进行比较。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 *P.gingivalis*的检测结果

*P.gingivalis*的检测结果如表1所示。在CP组和对照组,龈下菌斑中*P.gingivalis*检出率分别为74.44%和23.33%,卡方值为52.07,两者间差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 PG0717基因的检测结果

P.gingivalis PG0717基因的检测结果如表2所示。在CP组和对照组*P.gingivalis*阳性的龈下菌斑中,PG0717基因的检出率分别为56.22%和41.27%,卡方值为4.50,二者之间的差异具有统计学意义($P<$

0.05)。

表 1 *P.gingivalis*阳性检出率

Tab 1 The results of occurrences of <i>P.gingivalis</i>				
组别	<i>P.gingivalis</i>		合计	检出率(%)
	+	-		
CP组	201	69	270	74.44
对照组	63	207	270	23.33*

注：*与CP组相比， $P<0.01$

表 2 *P.gingivalis* PG0717基因的阳性检出率

Tab 2 The results of occurrences of PG0717 gene				
组别	<i>P.gingivalis</i>		合计	检出率(%)
	+	-		
CP组	113	88	201	56.22
对照组	26	37	63	41.27*

注：*与CP组相比， $P<0.05$

PG0717基因检测的电泳结果如图1所示。阳性对照(*P.gingivalis* W83菌株)PG0717基因特异性引物检测为阳性，而阴性对照(*P.gingivalis* ATCC 33277菌株)和空白对照(无菌去离子水)PG0717基因特异性引物检测为阴性，说明PG0717基因特异性引物具有较高的特异性和敏感性。

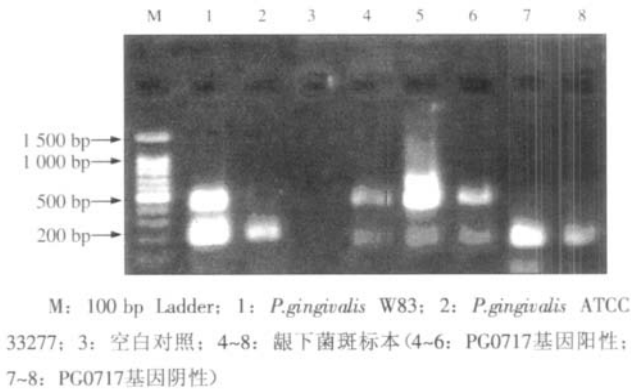


图 1 牙龈卟啉单胞菌PG0717基因电泳图

Fig 1 Electropherogram of PG0717 gene of *P.gingivalis*

2.3 CP组PG0717基因检出与临床牙周指数的关系

根据PD、CAL的深度和是否存在牙周探诊出血将牙周病变位点分组，检测CP组PG0717基因检出与这些牙周指数的关系，如表3所示。随着牙周组织炎症程度的增加，PG0717基因检出率呈现增高趋势。对*P.gingivalis*检测阳性的龈下菌斑标本进行PCR检测发现：在PD<4 mm、4~6 mm和PD>6 mm的受试位点中，PG0717差异片段检出率分别为49.25%、51.02%和78.95%，可见随着牙周袋深度增加，PG0717差异片段的检出率呈现增高趋势；同时，探诊出血阳性位点该基因片段的检出率显著高于阴性位点($\chi^2=42.01$ ， $P<0.01$)。

表 3 慢性牙周炎组PG0717基因检出与PD、CAL和BOP的关系

Tab 3 The relationships between occurrences of PG0717 gene and PD, CAL and bleeding on probing of the chronic periodontitis patients				
牙周临床指标		位点数(个)	<i>P.gingivalis</i> 阳性位点数(个)	PG0717检出率[个(%)]
PD	<4 mm	98	67	33(49.25)
	4~6 mm	127	98	50(51.02)
	>6 mm	45	38	30(78.95)*
CAL	<3 mm	66	41	22(53.66)
	3~5 mm	138	110	61(55.45)
	>5 mm	66	50	30(60.00)
BOP	+	220	194	112(57.73)
	-	50	7	1(14.29)*

注：*与PD<4 mm和4~6 mm位点相比， $P<0.01$ ；*与BOP阳性位点相比， $P<0.01$

3 讨论

牙周组织炎症的发生和发展是定植于牙周袋中的致病菌与宿主免疫和炎症反应相互作用的结果。牙龈卟啉单胞菌是革兰阴性的专性厌氧菌，是重要的牙周可疑致病菌之一。牙龈卟啉单胞菌产生的多种致病毒力因子与牙周组织病变程度密切相关^[5-7]。本实验慢性牙周炎组龈下菌斑的*P.gingivalis*阳性率为74.44%，明显高于对照组(23.33%)，进一步证明*P.gingivalis*是重要的牙周致病菌之一。

革兰阴性细菌脂蛋白是细胞外膜的重要组成部分。细菌脂蛋白刺激机体产生多种炎症因子和细胞因子(肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、白细胞介素-6和核因子- κ B等)，表现出内毒素样活性^[8]。细菌LP能够协同内毒素和细菌DNA上调相互的模式识别受体，增强致病性，同时其还具有协同增强其他细菌结构成分对相应受体的作用。模式受体表达的上调是增强宿主抵抗病原菌入侵以及天然免疫反应的重要分子基础^[9]。Hasebe等^[10]发现福塞斯坦纳菌LP能够诱导牙龈上皮细胞、单核细胞/巨噬细胞产生致炎的细胞因子，引发骨吸收，降解细胞外基质，直接破坏牙周组织；协助细菌细胞侵入宿主，引发上皮细胞和单核细胞/巨噬细胞的凋亡反应，借此来发挥它在口腔感染中的重要毒力作用。由PG1828编码的三乙酰脂蛋白(命名为PG1828LP)能够通过Toll样受体-2依赖途径和Toll样受体-1/6非依赖途径激活宿主细胞，引发炎症反应^[11]。Asai等^[12]运用等位基因重

组技术构建*P.gingivalis* PG1828基因突变株,与野生株相比,牙龈成纤维细胞产生细胞因子量显著减少;在小鼠模型检测中发现毒性显著下降,结果提示PG1828LP在牙周组织炎症过程中发挥重要作用。

林莉等^[13]利用抑制消减杂交技术构建*P.gingivalis*高毒力株W83和低毒力株ATCC 33277的消减文库,得到36个在*P.gingivalis* W83菌株中特有而在ATCC 33277菌株中缺乏的克隆子;其中,196 bp的差异基因片段是PG0717基因的一部分。PG0717基因产物为脂蛋白,与牙龈卟啉单胞菌对宿主的侵袭性和细菌的毒力相关。

本研究对*P.gingivalis*阳性的龈下菌斑标本检测发现,PG0717在慢性牙周炎患者中检出率显著高于牙周健康人群,提示存在该基因片段的*P.gingivalis*可能与慢性牙周炎发生发展关系更为密切。随慢性牙周炎患者牙周组织炎症程度的加重,PG0717基因检出率呈现增高趋势,提示该基因与*P.gingivalis*的致病性相关,为慢性牙周炎的高致病性基因。对于PG0717基因及其编码的脂蛋白在慢性牙周炎发生发展过程中的致病机制,尚需进一步实验研究。

【参考文献】

- [1] Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*[J]. Int Immunol, 2004, 16(10):1431-1437.
- [2] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions[J]. Ann Periodontol, 1999, 4(1):1-6.
- [3] de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study[J]. J Periodontol, 2007, 78(6):965-973.
- [4] 潘春玲, 潘亚萍, 林莉, 等. 牙龈卟啉单胞菌在龈下菌斑和颊黏膜中的检测[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(5):377-379.
PAN Chun-ling, PAN Ya-ping, LIN Li, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells and subgingival plaque[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(5):377-379.
- [5] Zhao L, Wu YF, Meng S, et al. Prevalence of fimA genotypes

- of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults[J]. J Periodontal Res, 2007, 42(6):511-517.
- [6] Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(2):123-128.
 - [7] 方广云, 苏征, 陈蕾, 等. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖对人牙周膜成纤维细胞胶原吞噬作用的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4):339-341.
FANG Chang-yun, SU Zheng, CHEN Lei, et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on collagen phagocytosis by human periodontal ligament fibroblasts[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(4):339-341.
 - [8] Nakamura J, Shibata K, Hasebe A, et al. Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide(FSL-1) in normal human gingival fibroblasts[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(3):151-158.
 - [9] 黄宏, 蒋建新, 朱佩芳, 等. 细菌脂多糖、脂蛋白和DNA对小鼠肺巨噬细胞体外激活的协同作用[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(21):1468-1472.
HUANG Hong, JIANG Jian-xin, ZHU Pei-fang, et al. The synergistic effects of lipopolysaccharide, bacterial lipoprotein and bacterial DNA on mouse alveolar macrophage activation[J]. Chin J Med, 2005, 85(21):1468-1472.
 - [10] Hasebe A, Yoshimura A, Into T, et al. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease[J]. Infect Immun, 2004, 72(3):1318-1325.
 - [11] Makimura Y, Asai Y, Taiji Y, et al. Correlation between chemical structure and biological activities of *Porphyromonas gingivalis* synthetic lipopeptide derivatives[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 146(1):159-168.
 - [12] Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, et al. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling[J]. Infect Immun, 2005, 73(4):2157-2163.
 - [13] 林莉, 潘亚萍, 李琛. 牙龈卟啉单胞菌不同毒力株差异的比较研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(12):734-738.
LIN Li, PAN Ya-ping, LI Chen. Comparison between genes of highly toxic strain and minimally toxic strain of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Chin J Stomatol, 2006, 41(12):734-738.

(本文编辑 汤亚玲)

《口腔美学比色》出版发行

由Stephen JC等编著,郭航、刘峰等翻译的《口腔美学比色》由人民军医出版社于2008年5月出版发行。本书着重阐述了颜色在口腔医学中的应用和影响牙齿颜色的相关因素,有助于口腔医师和技师解决相关临床问题;重点介绍了比色程序,详细描述了复合树脂直接分层修复;特别介绍了数字比色技术,读者可从中深入了解颜色测量技术及其在技工室和临床上的应用,并可通过大量典型病例、图解了解单颗前牙冠美学修复和多个前牙修复体的临床应用。本书定价156.00元,图文并茂,内容翔实,可供口腔医师学习参考。

人民军医出版社