

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0331-03

牙周可疑致病菌对胶原包被羟磷灰石黏附的体外实验研究

孙昌娟¹, 杨 禾², 雷朝锋¹, 徐 屹², 吴亚菲²

(1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学;

2. 四川大学华西口腔医院 牙周科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 比较对牙根面具有黏附能力的具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和伴放线菌嗜血菌对胶原包被的羟磷灰石实验膜(C-HA)的黏附能力, 初步探讨以上牙周可疑致病菌在牙根表面形成菌斑生物膜的能力。方法 采用同位素闪烁计数法测定上述4种细菌黏附至C-HA表面的黏附量及黏附率, 比较其黏附能力。结果 培养相同时间, 不论是培养24 h还是培养48 h, 4种不同细菌两两比较, 具核梭杆菌ATCC 10953和牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277对C-HA表面黏附率的差异无统计学意义; 中间普氏菌ATCC 25611和伴放线菌嗜血菌ATCC 29523的黏附率之间差异也无统计学意义, 但是具核梭杆菌ATCC 10953和牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277对C-HA表面的黏附率显著高于中间普氏菌ATCC 25611和伴放线菌嗜血菌ATCC 29523($P<0.001$)。同一种细菌, 在培养不同时间即培养24 h和48 h, 对C-HA表面黏附率的差异均无统计学意义。结论 不同的牙周可疑致病菌对胶原包被的羟磷灰石的选择性黏附作用不同, 具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌对胶原有较强的亲和作用, 在细菌的局部定植过程和牙周炎的进展和复发中可能发挥重要作用。

[关键词] 牙周可疑致病菌; 黏附; 胶原包被的羟磷灰石实验膜

[中图分类号] R780.1 [文献标识码] A

Study of adherence of periodontal pathogens to collagen-treated hydroxyapatite SUN Chang-juan¹, YANG He², LEI Chao-feng¹, XU Yi², WU Ya-fei². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective The ability of oral bacteria to adhere to tooth surface is associated with their pathogenicity. The objective of this study was to compare the ability of 4 strains of periodontal pathogens attaching to collagen-treated hydroxyapatite(C-HA) beads in order to evaluate the ability of the main periodontal pathogens to form the biofilm on root surface. Methods The binding amount and binding percentage of 4 strains to C-HA were measured and compared by ³H-labeled binding assay. 4 strains of periodontal pathogens were *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*)ATCC 10953, *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*) ATCC 33277, *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*) ATCC 25611 and *Hemophilus actinomycetemcomitans*(*H. actinomycetemcomitans*) ATCC 29523. Results The differences of the percentage of relative adherence between *F. nucleatum* ATCC 10953 and *P. gingivalis* ATCC 33277, as well as between *H. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 and *P. intermedia* ATCC 25611 could not be observed. However, the percentage of relative adherence of *F. nucleatum* ATCC 10953 and *P. gingivalis* ATCC 33277 was higher than that of *P. intermedia* ATCC 25611 and *H. actinomycetemcomitans* ATCC 29523($P<0.001$), no matter cultured 24 h or 48 h. No significant difference of the percentage of the relative adherence of each stain between 24 h and 48 h cultured time could be found. Conclusion *F. nucleatum* and *P. gingivalis* exhibited strong binding ability to C-HA. Their adherence to root surface may play an important role in their local aggregation, biofilm formation during the development and recurrence of the periodontitis.

[Key words] periodontal pathogens; adhesion; collagen-treated hydroxyapatite

[收稿日期] 2007-03-01; [修回日期] 2007-05-21

[基金项目] 国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA720A26)

[作者简介] 孙昌娟(1981-), 女, 河南人, 硕士

[通讯作者] 徐 屹, Tel: 028-85501439

口腔细菌的黏附对于菌斑生物膜的形成至关重要^[1-4]。口腔内不同细菌对牙根面的黏附能力不同, 细菌对牙根面的黏附能力与其致病性密切相关。胶

原是牙本质和牙骨质中的主要有机成分^[3],除了羟磷灰石,牙骨质的50%以上是胶原蛋白。具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和伴放线菌嗜血菌等牙周可疑致病菌对胶原具有一定的亲和力,即黏附能力。本研究旨在比较参与龈下菌斑的构成并占优势的牙周可疑致病菌具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F.nucleatum*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyringingivalis*, *P.gingivalis*)、中间普氏菌(*Prevotella intermedia*, *P.intermedia*)及伴放线菌嗜血菌(*Hemophilic.actinomycetemcomitans*, *H.actinomycetemcomitans*)对胶原包被的羟磷灰石实验膜(collagen-treated hydroxyapatite, C- HA)的黏附能力,即比较牙周可疑致病菌对人工模拟牙根面黏附能力的强弱,为探讨以上细菌在牙周炎致病机制中的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株的选择

具核梭杆菌 ATCC 10953、牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277、中间普氏菌 ATCC 25611 和伴放线菌嗜血菌 ATCC 29523 由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。

1.2 细菌的标记及菌液的准备

采用连续的厌氧菌培养技术,将培养 48 h 经鉴定为纯培养的上述细菌分别转种于 2 mL 含 10 μ Ci/mL ³H- 胸腺嘧啶核苷(由四川大学同位素室提供)的 BHI 液体培养基,80% N₂、20% CO₂、37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24、48 h,2 500 r/min 离心收集细菌,用浓度为 0.05 mol/L KCl(pH=6.0)的缓冲液洗涤 3 次,将菌体悬浮于含质量浓度为 5 g/L 的牛血清白蛋白的 KCl 缓冲液中,用比浊仪调整菌悬液的密度,使菌悬液的密度为 1.0 \times 10⁸ CFU/mL。

1.3 黏附实验步骤

将质量浓度为 3 g/100 mL 牛 型胶原溶液(四川大学生物科学院惠赠)稀释成质量浓度为 250 μ g/mL 的溶液备用。取 36 支离心管,每管含经 KCl 缓冲液浸泡的羟磷灰石(四川大学口腔医学院刘天佳惠赠)4 mg,随机分为阳性对照组、实验组及阴性对照

组。厌氧培养实验菌株 24 h。实验组分为具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和伴放线菌嗜血菌组。实验组每组 4 管,各加入胶原液 100 μ L,室温下 6 r/min 旋转 1 h 以在 HA 表面形成胶原实验性膜,KCl 缓冲液洗涤 2 次,每管加入牛血清白蛋白溶液 100 μ L,室温下 6 r/min 旋转 0.5 h,以封闭未包被的 HA 表面。吸取每管中的液体,分别加入 ³H 标记的已调好密度的菌液 100 μ L,室温下 6 r/min 旋转 1.5 h,KCl 缓冲液洗涤 3 次,最后进行同位素液体闪烁计数。以不加细菌的 C- HA 与实验组进行相同实验步骤,以 KCl 缓冲液代替菌悬液,作为阴性对照组。另取 100 μ L ³H 标记的菌悬液,60 $^{\circ}$ C 烘干过夜后,直接加入闪烁液,作为阳性对照。实验重复 2 次,取均值,比较不同菌株黏附量。黏附量以同位素液体闪烁计数值,即每分钟计数(counts per minute, CPM)表示,并计算黏附率(%)。黏附率(%)=(实验组 CPM- 阴性对照 CPM)/(阳性对照 CPM- 阴性对照 CPM) \times 100%。培养 48 h 细菌黏附能力测定方法同上。

1.4 统计方法

采用 SPSS 14.0 软件包对数据统计分析。用单因素方差分析比较各实验菌株黏附率之间的差异。

2 结果

培养 24 h 和 48 h 细菌的阳性对照组、实验组、阴性对照组的黏附量及实验组的黏附率见表 1 和表 2。比较各实验菌株黏附率之间的差异,结果显示:培养相同时间,不论是培养 24 h 还是培养 48 h,4 种不同细菌两两比较,具核梭杆菌 ATCC 10953 和牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 对 C- HA 表面的黏附率的差异无统计学意义;中间普氏菌 ATCC 25611 和伴放线菌嗜血菌 ATCC 29523 的黏附率之间差异无统计学意义,但是具核梭杆菌 ATCC 10953 和牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 对 C- HA 表面的黏附率显著高于中间普氏菌 ATCC 25611 和伴放线菌嗜血菌 ATCC 29523 ($P<0.001$)。同一种细菌,在培养不同时间即 24 h 和培养 48 h,对 C- HA 表面黏附率的差异均没有统计学意义。

表 1 培养 24 h 的 4 种细菌对 C- HA 的黏附量及黏附率 $\bar{x}\pm s$

Tab 1 Adhesion and adhesion percentage of four bacteria cultured 24 h attaching to C- HA $\bar{x}\pm s$

菌株	黏附量			黏附率(%)
	阳性对照组	实验组	阴性对照组	
具核梭杆菌	150.63 \pm 50.923	111.50 \pm 56.609	68.38 \pm 20.646	44.14 \pm 25.553
牙龈卟啉单胞菌	217.50 \pm 38.116	147.00 \pm 36.304	68.38 \pm 20.646	52.45 \pm 7.690
伴放线菌嗜血菌	4 083.13 \pm 89.045	317.00 \pm 56.194	68.38 \pm 20.646	6.17 \pm 6.453
中间普氏菌	312.75 \pm 35.123	110.88 \pm 8.969	68.38 \pm 20.646	17.42 \pm 2.805

表 2 培养48 h的4种细菌对C- HA的黏附量及黏附率 $\bar{x} \pm s$

Tab 2 Adhesion and adhesion percentage of four bacteria cultured 48 h attaching to C- HA $\bar{x} \pm s$

菌株	黏附量			黏附率(%)
	阳性对照组	实验组	阴性对照组	
具核梭杆菌	141.38 \pm 47.041	105.63 \pm 53.920	66.88 \pm 8.326	44.66 \pm 31.148
牙龈卟啉单胞菌	288.38 \pm 45.503	191.00 \pm 40.490	66.88 \pm 8.326	55.90 \pm 6.638
伴放线菌嗜血菌	2 135.25 \pm 128.607	226.00 \pm 69.568	66.88 \pm 8.326	7.61 \pm 2.155
中间普氏菌	761.13 \pm 88.228	150.88 \pm 87.436	66.88 \pm 8.326	11.33 \pm 8.631

3 讨论

牙根表面牙骨质的50%以上是胶原蛋白。本实验利用牛 型胶原包被羟磷灰石,从而模拟人工牙根表面。采用的羟磷灰石微珠表面积小,沉降迅速,容易与未附着的细菌分开^[4]。为排除细菌羟磷灰石微珠表面的非特异性吸附,用牛血清白蛋白阻塞羟磷灰石上未被实验性获得性膜覆盖的裸露部分。

本实验比较具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌及伴放线菌嗜血菌对C- HA的黏附能力,结果显示,培养相同时间,不论是培养24 h还是培养48 h,4种不同细菌两两比较,具核梭杆菌ATCC 10953和牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277对C- HA表面的黏附率显著高于中间普氏菌ATCC 25611和伴放线菌嗜血菌ATCC 29523($P<0.001$)。该结果提示,牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌之所以是龈下菌斑中的优势菌,不仅是由于它们存在一些毒力因子,还有可能是由于它们较强的黏附以及介导黏附的能力,从而在龈下菌斑生物膜形成初期大量黏附于根面,使其数量不断增加。本实验和吴红崑等^[5]的实验结果相似之处为牙龈卟啉单胞菌对C- HA的黏附率高于中间普氏菌对C- HA的黏附率。吴红崑等^[5]比较了培养18 h的变异链球菌ATCC 25175、黏性放线菌ATCC 15987、乳杆菌ATCC 4546、牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277及中间普氏菌ATCC 25611对胶原包被羟磷灰石实验膜的黏附能力,黏性放线菌对C- HA表面的黏附率为66%,显著高于其他细菌组,牙龈卟啉单胞菌(53%)及乳杆菌(50%)对C- HA表面的黏附率次之,变异链球菌(25%)及中间普氏菌(35%)

对C- HA表面的黏附能力最弱。由于细菌培养的时间、加入细菌的密度、羟磷灰石包被的胶原以及黏附率的统计方法不同,本研究所得黏附率的绝对值与之不同,本实验培养24 h的牙龈卟啉单胞菌和中间普氏菌的黏附率分别为52.45% \pm 7.690%和17.42% \pm 2.805%,培养48 h的牙龈卟啉单胞菌和中间普氏菌的黏附率分别为55.90% \pm 6.638%和11.33% \pm 8.631%。

本实验结果显示同一种细菌,在培养不同时间即24 h和48 h,对C- HA表面的黏附率差异均没有统计学意义,这可能是龈下细菌的生长周期比较长,培养24 h和培养48 h的细菌状况相似,但是,时间对细菌黏附力的影响还需要实验进一步研究。

[参考文献]

- [1] Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 513-552.
- [2] Dang H, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(2): 467-475.
- [3] Sandholm L. Their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease[J]. J Clin Periodontol, 1986, 13(1): 19-26.
- [4] Clark WB, Bammann LL, Gibbons RJ. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces [J]. Infect Immun, 1978, 19(3): 846-853.
- [5] 吴红崑,周学东,莫安春,等.根周细菌对胶原包被羟磷灰石粘附的体外实验研究[J].口腔医学研究,2002,18(4): 231-233. WU Hong-kun, ZHOU Xue-dong, MO An-chun, et al. The study of adherence of radicular bacteria to collagen-treated hydroxyapatite(C- HA)[J]. J Oral Sci Res, 2002, 18(4): 231-233.

(本文编辑 汤亚玲)

《国际口腔医学杂志》敬告读者·作者

《国际口腔医学杂志》自2008年1月开始扩版,大量刊登原创性论文。欢迎广大作者踊跃投稿。

《国际口腔医学杂志》编辑部