

[文章编号] 1000-1182(2007)06-0568-03

儿童口腔放线菌与儿童龋的关系初探

杨 燃¹, 邹 静², 李继遥³

(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 儿童口腔科; 3.牙体牙髓病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 检测儿童牙面龈上菌斑中的放线菌, 初步探讨口腔放线菌与儿童龋病发生的关系。方法 选择40例3~5岁儿童为研究对象, 其中无龋组和龋敏感组各20例。用无菌牙签收集乳牙表面3个不同部位的龈上菌斑。龋敏感组收集完整面、白垩斑和龋洞内(牙本质层)的菌斑; 无龋组收集唇面、邻面和𪚩面沟裂的菌斑。提取菌斑的细菌DNA, 用放线菌特异性引物进行聚合酶链反应, 对其电泳条带进行记录分析。结果 无龋组放线菌检出率为100%, 龋敏感组为95%, 二者间无统计学差异($P>0.05$)。内氏放线菌、戈氏放线菌、龋齿放线菌、衣氏放线菌和黏性放线菌在两组儿童的菌斑中均有检出, 前3种放线菌在无龋组的检出率高于龋敏感组, 二者间有统计学差异($P<0.05$)。2组儿童3个检测部位间的检出率无统计学差异($P>0.05$)。结论 放线菌是儿童乳牙龈上菌斑中的主要定植细菌, 可能是有益菌; 其检出情况与乳牙检测部位的关系不大。

[关键词] 放线菌; 聚合酶链反应; 龋齿; 儿童

[中图分类号] R781.1 [文献标识码] A

Study of the relationship between oral Actinomyces and childhood caries YANG Ran¹, ZOU Jing², LI Ji-yao³.

(1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Pediatric Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective Actinomyces are members of the indigenous oral microbiota which have been implicated in root caries, but their role in childhood caries initiation and progression is not well-understood. The distribution of Actinomyces in supragingival plaque on the primary teeth and the relationship between oral Actinomyces spp. and childhood caries primarily were investigated. Methods Forty children aged from three to five years old were divided into two groups. Twenty children were caries-free and twenty were caries-susceptible. Dental plaque samples from different places of the teeth were collected with sterile toothpick and polymerase chain reaction was performed with specific primers which were designed for this research. Results Actinomyces spp. were detected 100% in the caries-free group, while 95% in the caries-susceptible group. There was no significant differences between the two groups ($P>0.05$). Actinomyces naeslundii, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces gerencseriae, Actinomyces israelii and Actinomyces viscosus all could be detected in both groups. The prevalence of Actinomyces naeslundii, Actinomyces gerencseriae and Actinomyces odontolyticus were higher in caries-free group than those in caries-susceptible group ($P<0.05$), while the prevalence of Actinomyces israelii and Actinomyces viscosus had no significant difference between the two groups ($P>0.05$). Conclusion Actinomyces is the main colonized bacteria in the supragingival plaque of children. The prevalence of the Actinomyces spp. may have a negative relationship with the childhood caries, and has nothing to do with different places of the teeth.

[Key words] Actinomyces; polymerase chain reaction; caries; child

龋病是儿童最常见的一种口腔疾病, 除了主要致龋菌, 一些口腔常驻细菌在龋病的发生中也有重

要作用。放线菌是人类口腔早期定植细菌之一^[1], 目前对其与成人根龋的关系研究较多^[2], 而与儿童龋关系的研究较少, 且不同学者的结果不一^[3-4]。本研究采用聚合酶链反应技术对龋敏感儿童及无龋儿童乳牙不同部位菌斑中的放线菌定植情况进行检测, 初步探讨儿童口腔放线菌与儿童龋的关系。

[收稿日期] 2007-05-17; [修回日期] 2007-08-13

[基金项目] 国家“十五”科技攻关资助项目(2004BA720A24)

[作者简介] 杨 燃(1980-), 女, 四川人, 硕士

[通讯作者] 邹 静, Tel: 028-85503527

1 材料和方法

1.1 研究对象的选择

选择2005年7月—2006年2月在四川大学华西口腔医院儿童口腔科就诊的40例3~5岁儿童为研究对象，其中龋敏感组和无龋组各20例。龋敏感组每例患儿的龋失补牙数不低于10，至少有2颗上切牙的唇腭面发生龋坏，并深及牙本质层；无龋组每例患儿的龋失补牙数均为0。所有儿童在检查前1个月内未服用抗生素，无系统性疾病和先天性疾病。试验前与其家长签署知情同意书。

1.2 细菌标本的收集

收集菌斑前先用清水漱口1 min。由同一名专业口腔科医生用无菌牙签收集乳牙3个不同部位的龈上菌斑标本：龋敏感组儿童收集完整面、白垩斑和龋洞内（牙本质层）的菌斑，无龋组儿童收集唇面、邻面和𪚩面沟裂的菌斑。将取得的菌斑标本立即置于预先消毒灭菌的、装有转送液的EP管中，2 h内送至实验室冷藏于- 70 备用。

1.3 放线菌的特异性引物及通用引物的设计

本实验所用引物的基因序列来源于Genbank上的5种放线菌的16SrRNA基因序列，利用Primer 5.0软件设计。5种放线菌的基因序列号分别为内氏放线菌 M33911)、黏性放线菌 X53225)、衣氏放线菌 X82450)、戈氏放线菌 X80414)和龋齿放线菌 (X53227)。引物序列及预计扩增长度见表1，使用通用引物是为了检测提取物中是否含有细菌DNA。

1.4 DNA提取及PCR测定

本实验采用酚- 氯仿法提取细菌DNA。将细菌标本置于离心机上13 000 r/min离心8 min，弃上清，依次加入70 μL TE缓冲液（Tris- EDTA buffer）和质量浓度4.5 mg/mL溶菌酶20 μL，37 孵育1 h；加入9 μL质量分数10%的十二烷基磺酸钠和9 μL质量浓度0.5 mg/mL蛋白酶K，55 孵育2 h，再加入36 μL 5 mol/L NaCl和100 μL氯仿室温放置0.5 h；4 500 r/min离心15 min取上清，加入100 μL异丙醇沉淀；体积分数70%的乙醇洗涤，TE缓冲液溶解后通过电泳检测是否提取到细菌DNA，最后提取物放入- 20 冰箱储存备用。

PCR反应体系为30 μL，包括3 μL 10 ×buffer（其中含有15 mmol/L Mg²⁺）、25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL、25 mmol/L dNTP 0.36 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、0.3 μL Taq酶、2 μL模板DNA，其余部分用双蒸水补足。反应条件为94 预变性2 min，30个循环（94 20 s，53 30 s，60 40 s）后，72 延伸5 min。相对分子质量标记为Marker DNA Marker。

PCR扩增产物在质量分数为1.5%琼脂糖凝胶和TBE（Tris- Boric acid- EDTA buffer）缓冲液中电泳30 min，电压220 V，采用Bio- Rad凝胶成像系统观察并记录电泳条带。

表 1 特异性引物及预计扩增长度
Tab 1 Species- specific primers for Actinomyces and its expected product length

引物名称	引物序列 5 3)	预计扩增长度 bp)
内氏放线菌	(F)CCTTCTTCTGGATAACCGCA (R)CTACCCGTCAACCGCTT	172
黏性放线菌	(F)CCTTCTTCTGGATAACCGCA (R)CTACCCGTCAACCGCTT	157
衣氏放线菌	(F)TCACCTTCTGGATAACCGCTT (R)CACAAAAGTGAATCTTTCCGAG	89
戈氏放线菌	(F)TCACCTTCTGGATAACCGCTT (R)CAAACAGTGCCATCTTTCCCGA	90
龋齿放线菌	(F)CTTTGGGATAACGCCGGGAAAC (R)CTACCCGTCAAAGCCTTGTT	152
通用	(F)GGCTAACTACGTGCCAGCA (R)CACCGCTACACCAGGAGTT	189

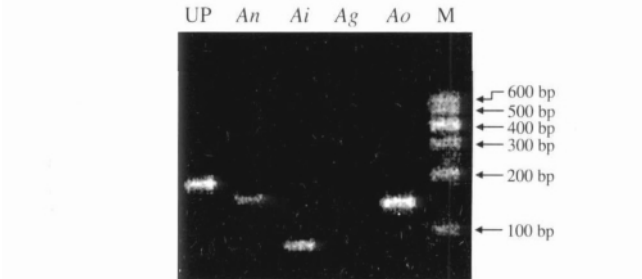
注：内氏放线菌和黏性放线菌的上下游引物完全相同，但是扩增出的产物差距为15 bp

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行分析，统计方法采用卡方检验。在进行放线菌检出率的组间比较时，将每个儿童乳牙3个不同部位的菌斑混合在一起，作为混合菌斑中放线菌的检出率；只要3个部位中有1个部位检出了放线菌，则认为该儿童牙菌斑中有放线菌存在。

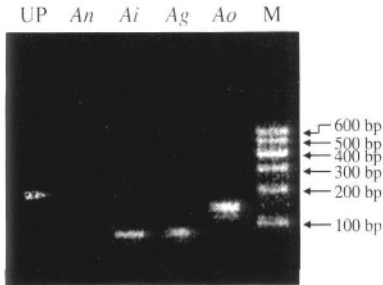
2 结果

无龋和龋敏感组儿童牙面不同部位菌斑中的放线菌检测的电泳结果见图1、2。



UP: 通用引物; An: 内氏放线菌; Ai: 衣氏放线菌; Ag: 戈氏放线菌; Ao: 龋齿放线菌; M: DNA Marker

图 1 无龋儿童𪚩面5种放线菌的PCR图谱
Fig 1 Specific-primer PCR of the Actinomyces detected in caries-free child



UP: 通用引物; An: 内氏放线菌; Ai: 衣氏放线菌; Ag: 戈氏放线菌; Ao: 龋齿放线菌; M: DNA Marker

图 2 龋敏感儿童龋洞内5种放线菌PCR图谱

Fig 2 Specific-primer PCR of the Actinomyces detected in caries-susceptible child

经PCR检测，无龋组乳牙菌斑中放线菌检出率为100%，龋敏感组为95%，二者之间无统计学差异

表 2 无龋组和龋敏感组儿童乳牙3个检测部位的放线菌检出率 (%)

Tab 2 Prevelence of Actinomyces in three different places of the primary teeth of caries-free and caries-susceptible child (%)

细菌	无龋组				龋敏感组			
	唇面	邻面	胎面	合计	完整面	白垩斑	龋洞	合计
内氏放线菌	100	100	100	100	20	10	25	45
黏性放线菌	20	15	10	20	5	5	5	10
衣氏放线菌	100	95	85	100	55	50	55	90
戈氏放线菌	85	80	60	100	30	35	30	50
龋齿放线菌	90	85	95	100	5	10	5	15

3 讨论

牙菌斑细菌在龋病发病中占有重要地位。生态菌斑学说认为，在牙面菌斑的生态失去平衡的条件下，定植于口腔中正常菌群的组成及比例将会发生改变，一些细菌会成为条件致病菌。这些致龋菌可产生大量致龋物质，超过了身体抵抗力，导致龋病发生^[9]。根据生态菌斑学说，儿童龋的发生并不是单一致龋菌的作用，而是多种细菌的混合感染，是在变形链球菌、乳杆菌、放线菌、韦荣菌、奈瑟菌等口腔常驻菌的共同作用下，由于生态平衡失调引起致龋物质在牙面堆积的结果。

本研究发现放线菌广泛存在于儿童乳牙龈上菌斑中，支持放线菌是儿童口腔主要定植细菌的观点^[3-4]。此外，本研究发现，内氏放线菌、戈氏放线菌和龋齿放线菌在无龋儿童中的检出率高于龋敏感组，笔者认为这3种放线菌在维持菌斑生态平衡中起着重要的作用，很可能是有益菌，但这一假设需要经进一步的大样本定量研究证实。本研究结果还显示，儿童口腔放线菌的检出情况与乳牙检测部位的关系不大，提示放线菌的存在可能与菌斑的生态平衡有着重要的关系，放线菌在龋病发生中的作用

($P>0.05$)；5种放线菌在2组儿童的菌斑中都有检出。无龋和龋敏感组儿童乳牙不同部位的放线菌检出率见表2。由表2可见，3个检测部位间的检出率无统计学差异 ($P>0.05$)。就总体检出率来看，无龋组菌斑中内氏放线菌、衣氏放线菌、戈氏放线菌和龋齿放线菌的检出率均为100%，黏性放线菌为20%；龋敏感组衣氏放线菌、戈氏放线菌和内氏放线菌的检出率较高，分别为90%、50%和45%，黏性放线菌和龋齿放线菌的检出率较低，分别为10%和15%。内氏放线菌、戈氏放线菌和龋齿放线菌在无龋组的检出率高于龋敏感组 ($P<0.05$)，而两组间衣氏放线菌和黏性放线菌的检出率差别不大，无统计学意义 ($P>0.05$)。

可能并不是产生致龋物质，而是通过改变菌斑生态平衡导致其余致龋菌毒力增强而导致龋病发生。

[参考文献]

[1] Sarkonen N, K n nen E, Summanen P, et al. Oral colonization with Actinomyces species in infants by two years of age[J]. J Dent Res, 2000, 79 (3) : 864- 867.

[2] 李 红, 周学东, 李继遥. 放线菌的基因型及其与根面龋发生的关系[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 16 (1) : 49- 50.

LI Hong, ZHOU Xue-dong, LI Ji-yao. The relationship between Actinomyces genotype and root caries[J]. Chin J Microecology, 2003, 16 (1) : 49- 50.

[3] Tang G, Yip HK, Samaranyake LP, et al. Actinomyces spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries[J]. Caries Res, 2003, 37 (5) : 381- 390.

[4] Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, et al. The predominant microflora of nursing caries lesions[J]. Caries Res, 2001, 35 (6) : 397- 406.

[5] 周学东, 岳松龄. 实用牙体牙髓病治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004 :108- 110.

ZHOU Xue-dong, YUE Song-ling. Applied conservative dentistry [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004 :108- 110.

(本文编辑 李 彩)