

[文章编号] 1000-1182(2007)01-0042-04

伴放线菌嗜血菌在慢性牙周炎患者和牙周健康者中的分布

孟 姝¹, 吴亚菲², 杨 禾¹, 赵 蕾¹, 欧阳玉玲¹

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 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 分析伴放线菌嗜血菌在慢性牙周炎患者和牙周健康者中的分布情况。方法 选择116例慢性牙周炎患者(CP组)和111例牙周健康者(健康组)为研究对象。CP组选取磨牙区牙周袋最深的2个患牙的探诊深度最深点作为患牙的取样位点, 同时选取磨牙或前磨牙区1个健康牙的近中位点作为健康牙的取样位点; 健康组选取上颌第一磨牙近中位点作为取样位点。收集取样位点的龈下菌斑, 提取DNA, 用16S rRNA聚合酶链反应检测伴放线菌嗜血菌的分布; 同时检查并记录取样牙的牙周临床指数(包括探诊深度、临床附着丧失和探诊出血), 分析伴放线菌嗜血菌检出率和牙周临床指数的关系。结果 CP组患牙伴放线菌嗜血菌检出率为33.62%, 明显高于CP组健康牙和健康组($P<0.01$)。伴放线菌嗜血菌检出率随着患者年龄的增加而降低, 随着探诊深度、临床附着丧失的增加而增加, 探诊出血阳性患牙的检出率(37.07%)也明显高于探诊出血阴性的患牙(7.41%)($P<0.05$)。结论 伴放线菌嗜血菌检出率随着牙周炎症程度的加重而升高, 与慢性牙周炎的发生发展具有密切的联系。

[关键词] 伴放线菌嗜血菌; 慢性牙周炎; 聚合酶链反应

[中图分类号] R781.4 [文献标识码] A

Distribution of *Haemophilus actinomycetemcomitans* in Chronic Periodontitis Patients and Periodontally Healthy Subjects MENG Shu¹, WU Ya-fei², YANG He¹, ZHAO Lei¹, OU-YANG Yu-ling¹. (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the prevalence of *H. actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis (CP) patients and periodontally healthy adults. Methods 116 chronic periodontitis patients and 111 periodontally healthy adults were included. In each CP patient, subgingival plaque samples were collected from two sites of different molars with the greatest probing depth (PD) and one periodontally healthy site (PD ≤ 3 mm). The samples of periodontally healthy adults were obtained from the mesio-buccal site of one first upper molar. Bacteria DNA were extracted for detection of *H. actinomycetemcomitans* by 16S rRNA PCR. Results The prevalence for *H. actinomycetemcomitans* of diseased sites (33.62%) was significantly higher than that of healthy sites from CP patients (0.86%) and the periodontally healthy sites (0.90%) ($P<0.01$). No significant difference was observed between male and female CP patients ($P>0.05$). A decreasing trend of *H. actinomycetemcomitans* was observed as the age increased. And the pocket depth and clinical attachment loss was associated with the occurrence of *H. actinomycetemcomitans* in a positive mode. And *H. actinomycetemcomitans* was more often detected in the bleeding sites on probing. Conclusion *H. actinomycetemcomitans* was more frequently detected in periodontitis sites than periodontally healthy sites. For CP patients, a higher prevalence was associated with the seriously involved sites than those moderate and mild implicated sites. *H. actinomycetemcomitans* is considered to be the one of the periopathogens involved in the etiology of chronic periodontitis.

[Key words] *Haemophilus actinomycetemcomitans*; chronic periodontitis; polymerase chain reaction

伴放线菌嗜血菌(*Haemophilus actinomycetemcomitans*, *H. actinomycetemcomitans*)以前被称为伴放

线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 是主要的牙周炎可疑致病菌之一, 与侵袭性牙周炎的发生发展关系密切。此外, 慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)患者龈下菌斑中也经常发现*H. actinomycetemcomitans*的存在, 但对其在CP人群中的分布情况 不同学者的研究结果差异较大 这种差异

[收稿日期] 2006-09-20; [修回日期] 2006-12-12

[基金项目] 国家“十五”科技攻关资助项目(2004BA720A26)

[作者简介] 孟 姝(1979-), 女, 四川人, 博士研究生

[通讯作者] 吴亚菲, Tel: 028-85501471

可能是由于人种和地域的不同,在很大程度上也受检测方法的影响。本研究采用目前国际通用的16S rRNA聚合酶链反应(16S rRNA polymerase chain reaction, 16SrRNA PCR)技术,检测中国CP患者和健康人龈下菌斑中*H. actinomycetemcomitans*的分布,并对其分布与牙周临床指数的关系进行分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象的选择

根据1999年牙周病学分类的慢性牙周炎诊断标准^[1],选择2005年10月—2006年3月在四川大学华西口腔医院牙周科就诊的慢性牙周炎初诊患者116例为CP组,其中男67例,女49例,年龄20~75岁,平均(47.88±1.75)岁。要求全口存留牙不少于16颗,至少有4颗磨牙,且至少有2个磨牙探诊深度(probing depth, PD)超过4 mm。另外选择成都市4个社区的牙周健康者111例为健康组,其中男33例,女78例,年龄20~75岁,平均(44.55±1.03)岁。要求全口存留牙不少于20颗,至少有4颗磨牙,全口牙平均PD 3 mm,无临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL),无明显牙龈红肿或退缩,无探诊出血(bleeding on probing, BOP),口腔内无黏膜病损。

CP组和健康组所有受试者纳入研究前1个月内均未服用任何抗菌药物和非甾体类药物,3个月内未行牙周治疗,妇女无妊娠,所有患者知情同意。

1.2 取样位点的选择

1.2.1 CP组患牙的取样位点 CP组患者选取磨牙区牙周袋最深的两个患牙,该牙探诊深度最深的位点为患牙的取样位点。

1.2.2 CP组健康牙的取样位点 选择CP组患者磨牙区或前磨牙区的1个牙周健康牙的近中位点为取样位点,该牙要求PD 3 mm, CAL 1 mm,无明显牙龈红肿或退缩,无探诊出血。

1.2.3 健康组取样位点的选择 健康组选取上颌第一磨牙近中位点作为取样位点。

1.3 龈下菌斑的采集

去除龈上菌斑后,无菌棉球隔湿、干燥,插入无菌纸尖直至牙周袋或龈沟底部,静置10 s,取出后置于500 μL TE液中,-20℃冻存备用。

1.4 细菌DNA的提取

冻存的龈下菌斑样本室温解冻30 min,振荡混匀,取适量标本与25% Chelex-100混合,56℃水浴30 min,100℃水浴10 min,4℃下15 000 r/min离心5 min,收集DNA上清液,-20℃冻存备用。

1.5 16SrRNA PCR反应

1.5.1 PCR引物序列 16SrRNA PCR引物序列为5 -

GCTAATACCGCGTAGAGTCGG-3'; 5 - ATTCACA-CCTCACTTAAAGGT-3',扩增片段预期大小为443 bp。

1.5.2 PCR反应体系 PCR反应总体积为25 μL,含DNA模板2.5 μL,10×Taq Buffer 2.5 μL,2 mmol/L dNTP 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,0.01 mmol/L的上下游引物各0.625 μL,Taq DNA聚合酶0.125 μL,用无菌双蒸水补足体积。以*H. actinomycetemcomitans* ATCC 29533 DNA为阳性对照,等体积去离子水作为阴性对照。

1.5.3 PCR反应条件 预变性94℃ 5 min后,进入主循环,包括36个循环:94℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,最后72℃延伸7 min。

1.5.4 PCR扩增产物的检测 PCR反应后取扩增产物5 μL行1.5%琼脂糖凝胶电泳,DNA染料为溴乙锭替代物GoldView™,凝胶成像分析仪下观察结果。

1.6 牙周临床指数的检测

由4位经过培训的牙周专科医生检查并记录取样牙的PD、CAL和BOP,4位医生的检查结果经一致性检验kappa值为0.8,一致性良好。

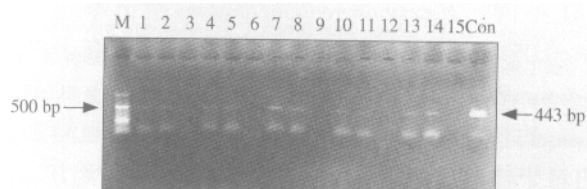
1.7 统计学分析

应用SPSS 10.0软件包进行统计学分析,计量资料采用独立样本t检验,计数资料采用卡方检验。

2 结果

2.1 CP组和健康组*H. actinomycetemcomitans*检出率

H. actinomycetemcomitans 16S rRNA PCR的电泳结果如图1所示。CP组232个患牙*H. actinomycetemcomitans*阳性的有78个,检出率33.62%,其中在同一患者的2个患牙同时检出的有25例,仅1个患牙检出的有28例。CP组116个健康牙仅有1个*H. actinomycetemcomitans*阳性(0.86%),患者为54岁男性。健康组111个牙齿也仅有1个检出*H. actinomycetemcomitans*,检出率0.90%。经统计学检验,CP组患牙的*H. actinomycetemcomitans*检出率明显高于CP组健康牙和健康组($P<0.01$)。



M: Marker; 1、2、4、5、7、8、10、11、13、14: *H. actinomycetemcomitans* 阳性; 3、6、9、12、15: *H. actinomycetemcomitans* 阴性; Con: 阳性对照

图1 *H. actinomycetemcomitans* 16S rRNA PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Electrophoresis results of PCR products with *H. actinomycetemcomitans* species-specific 16S rRNA primer

2.2 H.actinomycetemcomitans检出率与患者性别、年龄的关系

CP组不同性别和年龄段的患者H.actinomycetemcomitans检出情况见表1。由表1可见，H.actinomycetemcomitans检出率在不同性别的患者间无统计学差异($P>0.05$)；而在不同年龄段之间则有统计学差异($P<0.05$)，20~35岁年龄组检出率最高，随着年龄的增加，检出率逐渐下降。

表 1 CP组不同性别和年龄段患者H.actinomycetemcomitans检出情况

Tab 1 Prevalence of H.actinomycetemcomitans in CP patients of different gender and age group

项目		人数	牙数	H.actinomycetemcomitans阳性	
				牙数	比例(%)
性别	男	67	134	45	33.58
	女	49	98	33	33.67
年龄(岁)	20~35	17	34	15	44.12
	36~55	66	132	48	36.36
	56~75	33	66	15	22.73

2.3 H.actinomycetemcomitans检出率与PD、CAL和BOP的关系

CP组和健康组PD、CAL和BOP的测量结果见表2，CP组患牙的临床指数明显高于CP组健康牙和健康组。

表 2 CP组和健康组的临床指数测量结果

Tab 2 The clinical index of sampled sites of both CP patients and healthy subjects

组别		牙数	PD(mm)	CAL(mm)	BOP阳性(个)
CP组	患牙	232	6.34 ±1.54	6.59 ±2.19	205
	健康牙	116	2.26 ±0.48	0.63 ±0.35	0
健康组		111	2.08 ±0.66	0	0

CP组患牙H.actinomycetemcomitans检出率与PD、CAL和BOP的关系见表3。由表3可见，患牙的PD、CAL不同，H.actinomycetemcomitans检出率也不同($P<0.05$)：PD 7 mm的患牙检出率明显高于PD为4~6 mm者，而PD 4 mm的患牙检出率为0；CAL 6 mm的患牙检出率最高，3~5 mm次之，CAL 2 mm的患牙检出率最低(为0)。由此可见，CP组H.actinomycetemcomitans检出率随患牙PD、CAL的增加而增加，即随着牙周组织破坏程度的加重而升高。此外，BOP阳性位点的H.actinomycetemcomitans检出率为37.07%，而阴性位点的检出率仅为7.41%，二者间有统计学差异($P<0.05$)，提示牙周炎活动性部位H.actinomycetemcomitans的检出率明显升高。

表 3 H.actinomycetemcomitans检出率与CP组患牙PD、CAL和BOP的关系

Tab 3 Relationship of the prevalence of H.actinomycetemcomitans in CP patients with clinical index

项目		位点数	H.actinomycetemcomitans阳性	
			牙数	比例(%)
PD	4 mm	7	0	0
	4~6 mm	134	39	29.10
	7 mm	91	39	42.86
CAL	2 mm	5	0	0
	3~5 mm	76	21	27.63
	6 mm	151	57	37.75
BOP	+	205	76	37.07
	-	27	2	7.41

3 讨论

H.actinomycetemcomitans是一种兼性厌氧的革兰阴性球杆菌，与局限性侵袭性牙周炎密切相关。但目前认为慢性牙周炎患者的龈下菌斑中也有H.actinomycetemcomitans存在，与牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌等共同在慢性牙周炎的发生发展中起作用。

有研究发现CP患者的H.actinomycetemcomitans检出率在30%左右，明显高于健康人^[2-6]，而另一些报道的检出率更高，高达60.4%~84.4%不等^[7-10]。笔者分析这些研究结果的差异可能是由于以下原因造成的：纳入研究人群的年龄、性别和牙周组织破坏程度不一致；取样位点和取样方法不同；检测细菌的实验室技术不同；人种、地域和生活习惯不同。研究证实在牙周探诊最深的位点取样能较准确地发现受试者是否携带有H.actinomycetemcomitans等细菌^[11]，因此本研究采用无菌纸尖收集患者2个牙周组织破坏最严重牙位的龈下菌斑，而且PCR检测方法灵敏性高，降低了假阴性的风险，但仍不能排除H.actinomycetemcomitans可能在其他位点存在的可能性。

本研究中，H.actinomycetemcomitans检出率和CP患者的性别没有明显关系，但和年龄有较明确的关系，年轻患者的检出率明显高于中、老年患者，与张贤华等^[2]的研究一致。H.actinomycetemcomitans广泛存在于年轻人口腔中^[12]，在刚开始发生牙周组织破坏的位点龈下菌斑中水平较高^[13]，随年龄增长有下降趋势^[14-16]，说明H.actinomycetemcomitans可能对年轻患者慢性牙周炎的发生起着重要的始动作用。

本研究中，H.actinomycetemcomitans检出率随CP患者牙周组织破坏程度的加重而上升，在PD和CAL

较高、炎症相对活跃的BOP阳性位点的检出率升高,与Wolff等^[17]的研究一致。但也有学者认为H.actinomycescomitans检出率随牙周袋的加深呈现减少的趋势^[14,18],可能是由于牙周袋的加深使厌氧环境增强,更有利于专性厌氧菌的生长,而H.actinomycescomitans属于兼性厌氧菌,在此环境下生长不利。但牙周袋是个复杂的生态环境,多种细菌处于共生状态,牙周袋深部专性厌氧菌为优势菌群,但在牙周袋浅部可能呈现专性厌氧菌、兼性厌氧菌和需氧菌混合感染的情况。研究证实,牙周袋中牙龈卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体和H.actinomycescomitans三者共同感染的比例高达63.3%^[19]。所以,H.actinomycescomitans检出率与PD、CAL的关系可能需要考虑更多因素的影响。

H.actinomycescomitans在牙周健康者龈下菌斑中的检出率很低^[2,7,12],本研究中111例牙周健康者的检出率仅为0.90%,说明H.actinomycescomitans不是牙周健康者龈下菌斑中的常驻菌。但也有研究的结果与之相反,Tan等^[8]应用PCR方法检测中国牙周健康者H.actinomycescomitans阳性率高达78%,甚至高于CP患者。关于CP患者健康位点H.actinomycescomitans检出率的研究较少,Choi等^[7]发现CP患者健康牙位的检出率为28.6%,而本研究仅为0.86%,笔者分析认为这是由于不同研究中对CP患者健康牙位的纳入标准不同造成的差异。

[参考文献]

[1] The American Academy of Periodontology. The new classification for periodontal diseases and conditions[J]. Ann Periodontol, 1999, 4(1):1-112.

[2] 张贤华, 吴织芬. 寡核苷酸探针检测龈下菌斑中伴放线放线杆菌的分布[J]. 实用口腔医学杂志, 2001, 17(3):227-229. (ZHANG Xian-hua, WU Zhi-fen. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival plaques in the patients with chronic periodontitis[J]. J Pract Stomatol, 2001, 17(3):227-229.)

[3] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions[J]. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11(4):266-273.

[4] van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, et al. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction[J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(11):1023-1028.

[5] Gajardo M, Silva N, Gomez L, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population[J]. J Periodontol, 2005, 76(2):289-294.

[6] Ali RW, Bakken V, Nilsen R, et al. Comparative detection frequency of putative periodontal pathogens in Sudanese and Nor-

wegian adult periodontitis patients[J]. J Periodontol, 1994, 65(11):1046-1052.

[7] Choi BK, Park SH, Yoo YJ, et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach[J]. J Periodontol, 2000, 71(9):1387-1394.

[8] Tan KS, Woo CH, Ong G, et al. Prevalence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in an ethnic adult Chinese population[J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(9):886-890.

[9] Mombelli A, Gmur R, Lang NP, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus[J]. J Clin Periodontol, 1999, 26(8):505-510.

[10] Yang HW, Huang YF, Chan Y, et al. Relationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes to periodontal condition: Prevalence and proportions in subgingival plaque[J]. Eur J Oral Sci, 2005, 113(1):28-33.

[11] Savitt ED, Darack AP, Killoy WJ, et al. Site selection criteria for microbiological testing of periodontal microorganisms[J]. J Periodontol, 1991, 62(9):558-561.

[12] Muller HP, Zoller L, Eger T, et al. Natural distribution of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans in young men with minimal periodontal disease[J]. J Periodontol Res, 1996, 31(6):373-380.

[13] Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 1987, 14(9):534-540.

[14] Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, et al. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in an Australian population[J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(12):1163-1171.

[15] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(2):134-144.

[16] Slots J, Feik D, Rams TE. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides intermedius in human periodontitis: Age relationship and mutual association[J]. J Clin Periodontol, 1990, 17(9):659-662.

[17] Wolff LF, Aepli DM, Pihlstrom B, et al. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease[J]. J Clin Periodontol, 1993, 20(10):699-706.

[18] Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population[J]. J Periodontol, 2003, 74(10):1460-1469.

[19] 蒋锦琴, 孙爱华, 阮萍, 等. 16S rDNA多重PCR检测牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌和齿垢密螺旋体及混合感染与慢性牙周炎病变程度关系[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(6):461-466. (JIANG Jin-qin, SUN Ai-hua, RUAN Ping, et al. Detection of Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans and Treponema denticola by multiplex PCR with 16S ribosomal DNA amplification and the correlation between mixed infection and lesions of chronic periodontitis[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(6):461-466.)

(本文编辑 吴爱华)