

中间普氏菌在家庭成员牙周菌斑中的分布调查

刘敏川 章锦才 张蕴惠 刘豫蓉 石四箴

摘要 目的:调查了解中间普氏菌在牙周健康人群中的分布状况。方法:收集符合纳入标准的60个家庭、181例受试者的牙周颈缘龈上菌斑和龈沟内的龈下菌斑,采用厌氧菌培养技术获得279株产黑色素的G⁻厌氧杆菌,然后进行产黑色素的G⁻厌氧杆菌的纯化培养及微量生化鉴定。结果:中间普氏菌在牙周较健康的父母和儿童牙周菌斑中均可检出,儿童群体中中间普氏菌阳性率达70.49%,而成人群体中中间普氏菌阳性率为43.33%,二者有显著性差异($P < 0.01$)。结论:中间普氏菌可能是易在牙周较早定植的固有组成细菌,属条件致病菌。该菌在牙周疾病进程中的确切作用尚需对受试者进行长期的追踪研究。

关键词 中间普氏菌 产黑色素的G⁻厌氧杆菌 牙周病

Distribution of *Prevotella intermedia* in the Periodontal Plaques of Children and Their Parents

Liu Minchuan, Zhang Jincai, Zhang Yunhui, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To investigate the distribution of *Prevotella intermedia* (*Pi*) among family members by culturing technique and biochemical identification. **Methods:** Of all 60 families, 181 subjects were included in the study. Supragingival and subgingival plaques were collected and cultured, 279 strains of black-pigmented gram-negative anaerobes were obtained. Biochemical identifications were performed. **Results:** *Pi* could be identified from parents and children with healthy periodontal status. The prevalence of *Pi* in children was 70.49%, which was significantly higher than that in adults (43.33%). **Conclusion:** The result indicates that *Pi* might be an opportunistic periodontal pathogen that could be colonized in periodontal plaques easily and early. To study the exact role of *Pi* in the pathogenesis of periodontitis, it is necessary to do longitudinal following study of the subjects.

Key words: *Prevotella intermedia* black-pigmented G⁻ anaerobic bacillus periodontitis

中间普氏菌(*Prevotella intermedia*, *Pi*)属产黑色素类的G⁻厌氧杆菌,它既是人类口腔的常驻菌群,又是最早定植于龈沟的专性厌氧菌之一。在出生1月的新生儿口内就可检出*Pi*,乳牙萌出可使*Pi*在幼儿口腔中的检出率从10%升至67%^{1,2}。*Pi*在牙周的定植数量可随龈沟的形成与加深增多,至青春期达到高峰。同时,大量的研究显示*Pi*与牙周炎、根尖周病和冠周炎等感染性疾病关系密切³⁻⁸。本研究采集牙周健康的正常家庭成员的龈上、龈下菌斑,通过细菌厌氧培养和生化鉴定,了

解*Pi*在不同家庭成员的牙周菌斑中的分布状况。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1997年4月~1997年12月在华西医科大学口腔医院正畸科门诊就诊的儿童及其父母为本实验的研究对象。纳入标准:无全身系统性疾病;取样前1个月未服用抗生素;各受检牙的牙龈退缩小于或等于2mm、附着丧失小于或等于2mm;牙周探诊不出血;同意加入试验并签定协议。纳入本研究的合格家庭共60个,其中成人120例,年龄28~47岁,平均40.35岁,儿童61例,年龄2~15岁,平均年龄10.75岁。

1.2 细菌学检查

1.2.1 菌斑采集、运送和处理 局部隔湿,用灭菌刮匙在下颌第一磨牙的近中舌侧及下前牙舌侧颈缘区取龈上菌

本研究为国家教委博士点基金资助项目(编号C1026)

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(刘敏川,章锦才,张蕴惠,刘豫蓉),同济大学口腔医学院(石四箴)

斑,对2~4岁的儿童则刮取下颌第二乳磨牙的远中舌侧龈上菌斑,将其置于含1ml pH 7.4的厌氧转送液(0.15%硫代乙醇酸钠,0.11%磷酸氢二钠,0.5%氯化钠,0.009%氯化钙)和上覆液体石蜡的灭菌小瓶内。然后刮除龈上菌斑,将两根消毒纸尖插入上述部位的龈沟最深部,停留15s取出,分别置入装有同样转送液和石蜡油的灭菌小瓶内,送实验室备用。2~4岁的儿童未取龈下菌斑。1h内完成标本的培养前处理。

1.2.2 菌斑细菌的培养 吸出收集有菌斑样本的小瓶中的石蜡油,在涡旋器上震荡2~3min,取1ml混匀的菌斑液用厌氧转送液作10倍系列稀释,取 10^3 和 10^5 稀释液各10 μ l转移至新鲜制备的、含5%无菌脱纤兔血和1%灭菌维生素K Hemin液的BHI固体培养平板上,玻棒推匀。在37 $^{\circ}$ C,10%CO $_2$ 、10%H $_2$ 和80%N $_2$ 的厌氧罐内培养72h。

1.2.3 目标菌的菌落形态观察、显微镜镜检及耐氧实验 取出培养皿,观察培养基上黑色或棕色、光亮、圆形、低突、直径0.5~2mm的菌落的生长情况,挑选目标菌涂片,革兰氏染色,显微镜镜检。接种产黑色素的G $^-$ 杆菌至BA固体培养基,37 $^{\circ}$ C有氧条件孵育48h,进行耐氧实验。

1.2.4 产黑色素的G $^-$ 杆菌的纯化培养及微量生化鉴定 将具有Pi典型菌落和菌体形态的单个菌落细菌接种在同前述成分的BHI固体培养基,进行次代纯培养。在37 $^{\circ}$ C、10%CO $_2$ 、10%H $_2$ 和80%N $_2$ 的条件下厌氧培养72h。用pH 7.2的PBS液洗脱,收集琼脂表面纯培养物,采用微量生化平板法及微量生化试管法对临床菌株进行生化鉴定⁹。以Pi ATCC 25611标准株为阳性对照。

1.3 统计学处理

将成人及儿童受检者中的产黑色素的G $^-$ 杆菌及Pi阳性率用华西医科大学卫生统计学教研室PEMS软件包进行两样本率卡方检验。

2 结 果

受试者中产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌和Pi的检出情况见表1。

表1 181例受试者中产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌和Pi的检出情况

组别	受试者例数	产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌阳性(%)	Pi阳性(%)
成人	120	85(70.83%)	52(43.33%)
儿童	61	49(80.33%)*	43(70.49%)**

注:* $P > 0.05$; ** $P < 0.001$

显微镜下见产黑色素菌落的菌细胞G $^-$ 、形态呈短杆或球杆状、长短不一、排列密集。耐氧实验表明所有的产黑色素的G $^-$ 杆菌均不能在有氧环境中存活和生长。卡方检验,产黑色素的G $^-$ 厌氧杆

菌阳性检出率,在成人与儿童群体间无显著性差异($P > 0.05$)。

134例有产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌检出的受试者中,经微量生化平板法与微量生化试管法一致鉴定为Pi检出阳性者95例,其中成人52例(43.33%),儿童43例(70.49%)。经检验Pi阳性率在成人和儿童群体之间存在显著性差异($P < 0.001$)。次代培养的产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌经染色镜检证实为纯培养物,成人组样本中分离到167株产黑色素G $^-$ 厌氧杆菌;儿童组样本中分离到112株。由成人标本分离所得菌株中有109株与Pi国际标准株的生化反应一致,而儿童标本分离所得菌株中有103株与Pi国际标准株的生化反应一致,其中20个家庭的父母双方或父母之一与子女的样本中均分离到了Pi。

3 讨 论

Pi是一种常见的牙周专性厌氧菌,90年代以前归于类杆菌属。Pi在含血的培养基上生长良好,并形成黑色或棕色的菌落,革兰氏染色阴性,菌体形态为长短不一、排列密集的短杆或球杆菌。早期研究发现Pi的检出率在牙周病变部位明显高于牙周健康部位,提示Pi与牙周疾病关系密切³。有关Pi毒力因子的文献揭示¹⁰,Pi既能削弱宿主的免疫反应,又能为牙周菌斑中不能裂解龈沟液中蛋白的微生物提供营养,促进其生长。因此有学者认为Pi可能在牙周病的发生发展中有重要作用。而牙周流行病学调查发现^{1,2},Pi在牙周正常的青少年群体中也可检出,并且是最早定植的牙周厌氧菌之一。但要阐明Pi在牙周疾病发生、发展中的作用及对青少年牙周健康的影响尚有待在基因水平对Pi作更深入的研究。

本研究以家庭成员为对象,探讨Pi在牙周正常人群中的分布。结果发现牙周状况良好的成人和儿童群体中均可检出包括Pi在内的产黑色素的G $^-$ 厌氧杆菌,牙周菌斑中分离出Pi的多数儿童,其父母样本中也能检出Pi。但Pi在儿童群体中的检出率显著高于成人($P < 0.001$)。这可能是儿童处于生长阶段,机体内某些生长因子有利于Pi进入处于“窗口状态”的龈沟获得定植和繁殖,而受检成人群体均牙周健康,其局部和全身因素对Pi

(下转第239页)

泛存在双向性,使得 PKC 亚型与肿瘤之间的关系非常复杂。SACC 发生发展与 PKC 亚型间关系的详尽机制有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Borner C, Giadagno SN, Hsiao WWL, et al. Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblasts. *J Biol Chem*, 1992, 267(18):12900~12910
- 2 Khan SG, Saxena R, Bickers DR, et al. Inhibition of ras P21 membrane localization and modulation of protein kinase C isozyme expression during regression of chemical carcinogen-induced murine skin tumors by lovastatin. *Mol Carcinog*, 1995, 12(1):205~210
- 3 Benzil DI, Finkelstein SD, Epstein MH, et al. Expression pattern of protein kinase C in human astrocytomas indicates a role in malignant progression. *Cancer Res*, 1992, 52(10):2951~2956
- 4 Kawakita N, Nagahata Y, Yoshizumi K, et al. An immunohisto-

- chemical study of glucagonoma conducted on the metastatic lymph nodes from a patient with recurrent metastatic glucagonoma: report of a case. *Surg Today*, 1994, 24(10):918~922
- 5 Schwartz GK, Jiang J, Kelsen D, et al. Protein kinase C: a novel target for inhibiting gastric cancer cell invasion. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(5):402~407
- 6 Liu B, Maher RJ, Hannun YA, et al. 12(S)-HETE enhancement of prostate tumor cell invasion: selective role of PKC alpha. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(15):1145~1151
- 7 Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(2):612~616
- 8 俞光岩主编. 涎腺疾病. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1994:163
- 9 Delage S, Chastre E, Empereur S, et al. Increase protein kinase C expression in human colonic Caco-2 cells after insertion of human Ha-ras or polyoma virus middle T oncogenes. *Cancer Res*, 1993, 53(12):2762~2770

(1999-03-17 收稿)

(上接第 236 页)

的定植没有明显促进作用,牙周微生态和宿主间已有的动态平衡阻止了 *Pi* 的过度增长,由此造成两个群体中 *Pi* 检出率的差异。

根据本研究结果,笔者认为 *Pi* 可能属于牙周固有菌群,因此能够在牙周正常的成人和儿童群体中检出,且在儿童中检出率较高。但当宿主的机体抵抗力下降,宿主与牙周菌斑微生态间平衡失调,*Pi* 也可能成为致病菌,协同其它牙周可疑致病菌导致牙周组织发生病损。

参考文献

- 1 Frisken KW, Higgins T, Palmer JM. The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. *Oral Microbiol Immunol*, 1990, 5(1):43~45
- 2 Koroñen E, Asikainen S, Saarela M, et al. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiol Immunol*, 1994, 9(3):136~141
- 3 Slots J, Bragd L, Wikström M, et al. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 1986, 13(6):570~577

- 4 Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontol Res*, 1980, 15(2):111~122
- 5 Wennström JL, Dahl G, Svensson J, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius*: predictors of attachment? *Oral Microbiol Immunol*, 1987, 2(4):158~162
- 6 Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, et al. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*, 1982, 53(4):223~230
- 7 Dahl G, Wikström M, Renvert S, et al. Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(10):2269~2274
- 8 Charbia SE, Haapasalo M, Shah HN, et al. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol*, 1994, 65(1):56~61
- 9 肖晓蓉. 口腔微生物学及实用技术. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1993:136~142
- 10 Jansen HJ, Genier D, van der Heven JS. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*, 1995, 10(3):138~145

(1998-12-24 收稿, 2000-01-26 修回)