

牙周致病菌的共聚及其对人工牙根面黏附力的影响

王耀生¹ 杜奇峰² 李永凯² 徐屹^{2,3}

(1.山西红十字口腔医院牙周科 太原 030001;

2.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 3.四川大学华西口腔医院牙周科 成都 610041)

[摘要] 目的 比较具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌等牙周病致病菌彼此之间的共聚力大小, 观察四者在具核梭杆菌介导下对人工牙根面黏附力的影响, 了解牙周生物膜结构中细菌间可能存在的相互作用。方法 目测具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此间的共聚力, 以放射性核素闪烁计数四者在具核梭杆菌黏附和未黏附状况下对胶原包被羟磷灰石(c-HA)的黏附间是否存在差异。结果 具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此间存在着共聚作用, 其中, 具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌、牙龈卟啉单胞菌与中间普雷沃菌间的共聚度均可达 4 度, 具核梭杆菌与其他三菌间的共聚度均大于 3 度。牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌在具核梭杆菌黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在具核梭杆菌未黏附时的黏附率, 具核梭杆菌在未黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在黏附后的黏附率。结论 具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此间均存在共聚关系, 具核梭杆菌可能对其他牙周病致病菌定植于牙菌斑起到了桥梁作用。

[关键词] 牙周致病菌; 共聚; 黏附; 胶原包被羟磷灰石膜

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.008

Coaggregation of periodontal pathogens and its effect on the attachment on artificial root surface Wang Yaosheng¹, Du Qifeng², Li Yongkai², Xu Yi^{2,3}. (1. Dept. of Periodontics, Shanxi Red Cross Stomatological Hospital, Taiyuan 030001, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The coaggregation abilities of 4 strains of periodontal pathogens *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*) and *Haemophilus actinomycetemcomitans* (*H.actinomycetemcomitans*) were compared. The changes of the ability of periodontal pathogens attaching to artificial root surface mediated by *F.nucleatum* were observed in order to investigate the possible interaction of the bacteria in periodontal biofilm. **Methods** The coaggregation degree among 4 strains of periodontal pathogens was investigated by a visual assay. Differences of the adherent percent of periodontal pathogens to collagen-coated hydroxyapatite(c-HA) under two conditions when *F.nucleatum* had already bond to c-HA and when *F.nucleatum* had not, were detected by radioisotope scintillation counter. **Results** The coaggregation among 4 studied strains was observed. The coaggregation degrees between *F.nucleatum* and *P.gingivalis*, as well as between *P.gingivalis* and *P.intermedia* reached 4. The coaggregation degrees of *F.nucleatum* with the other three bacteria were higher than 3. The adherent percent of *P.gingivalis*, *P.intermedia* and *H.actinomycetemcomitans* to c-HA when *F.nucleatum* had already bond to c-HA were higher than that when *F.nucleatum* had not. The adherent percent of *F.nucleatum* to c-HA when *F.nucleatum* had already bond to c-HA were lower than that when *F.nucleatum* had not. **Conclusion** The periodontal pathogens coaggregate. *F.nucleatum* may play a role as a bridge in the colonization of the other periodontal pathogens in the periodontal biofilm.

[Key words] periodontal pathogens; coaggregation; adhesion; collagen-coated hydroxyapatite

牙周致病菌共聚是牙周菌斑形成和成熟的重要步骤, 因此, 牙周病致病菌彼此间的共聚是决定牙周生物膜形成的关键因素。在具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌

[收稿日期] 2011-02-24; **[修回日期]** 2011-10-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30872872)

[作者简介] 王耀生(1984—), 男, 山西人, 硕士

[通讯作者] 徐屹, Tel: 028-85502343

等牙周致病菌中，具核梭杆菌可作为共聚桥连接口腔中的早、晚期定植细菌^[1]。本研究旨在通过目测和放射性核素闪烁计数来研究具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此间共聚力的强弱，具核梭杆菌介导下四菌对人工牙根面的黏附，即在具核梭杆菌在黏附和未黏附状况下，四菌对胶原包被羟磷灰石(collagen-coated hydroxyapatite, c-HA)的黏附率是否存在着差异，以了解四菌间的共聚关系，为抑制牙周生物膜形成提供依据。

1 材料和方法

1.1 牙周病致病菌间共聚度比较

1.1.1 试验菌株和培养条件 具核梭杆菌 ATCC 10953、牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277、中间普雷沃菌 ATCC 25611 和伴放线嗜血菌 ATCC 29523 由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。采用连续厌氧菌培养技术，将培养 48 h 经鉴定为纯培养的上述 4 种细菌分别转种于脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养液，再将其于含体积分数 80%N₂、10%H₂、10%CO₂，37 °C 的环境中厌氧培养 48 h。

1.1.2 共聚度目测 用低温高速离心机分离细菌(10 000×g、10 min、4 °C)，磷酸缓冲盐溶液洗菌 3 次，用磷酸缓冲盐溶液配制密度为 1×10⁹ 个每毫升的细菌悬液。在 4 种细菌中，取不同组合的两菌悬液各 1.5 mL 混合，微量搅拌器振荡 10 s 后分别在 30、45、60 min 时进行观察，记录共聚反应。目测共分 5 级，0 级：无沉淀，均匀混浊液；+1 级：有沉淀，均匀混浊上清液；+2 级：有沉淀，混浊上清液中有絮状；+3 级：有沉淀，清澈上清液中有絮状物；+4 级：有沉淀，完全清澈上清液。

1.2 放射性核素闪烁计数具核梭杆菌介导下四菌对人工牙根面的黏附

1.2.1 细菌标志和菌液的制备 细菌标志采用含 370 MBq 每毫升放射性活度的 ³H-胸腺嘧啶核苷(四川大学放射性核素室提供)BHI 培养液，细菌在含体积分数 80%N₂、10%H₂、10%CO₂，37 °C 的环境中厌氧培养 48 h。半径 8 cm，2 500 r·min⁻¹，4 °C，离心 15 min 后收集细菌。用 0.05 mol·L⁻¹ 的氯化钾缓冲液(pH6.0)洗涤 3 次，再将菌体悬浮于含 5 g·L⁻¹ 牛血清蛋白的氯化钾缓冲液，用比浊仪调整菌液密度为 1.0×10⁸ CFU·L⁻¹。

1.2.2 胶原溶液的制备 将质量浓度为 20 g·L⁻¹ 的牛 型胶原溶液(四川大学生物材料中心蒋波教授赠)稀释成质量浓度为 250 mg·L⁻¹ 的溶液备用。

1.2.3 c-HA 试验膜的制备 在 0.5 mL 离心管中加入羟磷灰石(hydroxyapatite, HA)4 mg，200 μL 氯化钾缓冲液浸泡过夜。次日吸去氯化钾缓冲液，每管加入已制备好的牛 型胶原溶液 100 μL，在旋转混匀仪上 6 r·min⁻¹ 室温下旋转 1 h，以在 HA 表面形成胶原试验性膜(collagen-coated hydroxyapatite, c-HA)，洗涤 3 次后加入牛血清清蛋白溶液，室温下 6 r·min⁻¹ 旋转 0.5 h，氯化钾缓冲液洗涤 3 次、吸干。

1.2.4 试验分组和黏附率分析 试验分为具核梭杆菌未黏附组和具核梭杆菌先黏附组(均为试验组)，阳性对照组和阴性对照组。具核梭杆菌未黏附组再分为 4 组，分别加入经 ³H-胸腺嘧啶核苷标志过的具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、伴放线嗜血菌和中间普雷沃菌菌液 100 μL，6 r·min⁻¹ 室温下旋转 1.5 h，氯化钾缓冲液洗涤 3 次，最后进行放射性核素液体闪烁计数。具核梭杆菌先黏附组同样分为 4 组，每组各加入未经 ³H-胸腺嘧啶核苷标志的具核梭杆菌 100 μL，6 r·min⁻¹ 室温下旋转 1.5 h，氯化钾缓冲液洗涤 3 次，每组再分别加入经 ³H-胸腺嘧啶核苷标志过的具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、伴放线嗜血菌和中间普雷沃菌菌液 100 μL，6 r·min⁻¹ 室温下旋转 1.5 h，氯化钾缓冲液洗涤 3 次后行放射性核素液体闪烁计数。以氯化钾缓冲液代替菌悬液，行与具核梭杆菌未黏附组相同步骤的试验后再行液体闪烁计数，作为阴性对照组。另取 ³H-胸腺嘧啶核苷标志过的具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、伴放线嗜血菌和中间普雷沃菌悬液 100 μL，直接进行液体闪烁计数，作为阳性对照。每组设 3 个平行管，取均值。试验重复 3 次。比较各菌株在具核梭杆菌未黏附和先黏附状况下的黏附量，计算黏附率。黏附量以放射性核素液体闪烁计数值，即每分钟闪烁计数(counts per minute, C_{pm})表示。黏附率=(试验组 C_{pm}-阴性对照 C_{pm})/(阳性对照 C_{pm}-阴性对照 C_{pm})×100%。

1.3 统计学分析

黏附量和黏附率均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 14.0 统计软件包进行统计分析。采用 *t* 检验分析比较各菌株在具核梭杆菌黏附和未黏附状况下黏附率之间的差异。

2 结果

2.1 牙周致病菌之间的共聚力

具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此之间存在共聚作用：具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌，牙龈卟啉单胞菌与中间普雷沃菌的共聚度均可达到 4 度，具核梭杆菌与其他 3 种细菌共聚度均大于 3 度，且四菌间的共聚度在 30 min 时可达到最大值(表 1~3)。

表 1 牙周致病菌 30 min 时的共聚度(0~4度)

Tab 1 Coaggregation degrees of periodontal pathogens in 30 min(0 to 4 degree)

牙周致病菌	具核梭杆菌	牙龈卟啉单胞菌	中间普雷沃菌	伴放线嗜血杆菌
具核梭杆菌	...	4	3	3
牙龈卟啉单胞菌	4	...	4	1
中间普雷沃菌	3	4	...	2
伴放线嗜血杆菌	3	1	2	...

2.2 具核梭杆菌介导下牙周致病菌对人工牙根面的黏附

4 种细菌的黏附量和黏附率见表 4、5。比较 4 种细菌在具核梭杆菌未黏附和先黏附两种状况下黏附率间的差异，结果牙龈卟啉单胞菌、中间普

雷沃菌和伴放线嗜血菌在具核梭杆菌先黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在具核梭杆菌未黏附时的黏附率($P<0.05$)。具核梭杆菌在具核梭杆菌未黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在具核梭杆菌先黏附时的黏附率($P<0.05$)。

表 2 牙周致病菌 45 min 时的共聚度(0~4度)

Tab 2 Coaggregation degrees of periodontal pathogens in 45 min(0 to 4 degree)

牙周致病菌	具核梭杆菌	牙龈卟啉单胞菌	中间普雷沃菌	伴放线嗜血杆菌
具核梭杆菌	...	4	3	3
牙龈卟啉单胞菌	4	...	4	2
中间普雷沃菌	3	4	...	2
伴放线嗜血杆菌	3	2	2	...

表 3 牙周致病菌 60 min 时的共聚度(0~4度)

Tab 3 Coaggregation degrees of periodontal pathogens in 60 min(0 to 4 degree)

牙周致病菌	具核梭杆菌	牙龈卟啉单胞菌	中间普雷沃菌	伴放线嗜血杆菌
具核梭杆菌	...	4	3	3
牙龈卟啉单胞菌	4	...	4	2
中间普雷沃菌	3	4	...	2
伴放线嗜血杆菌	3	2	2	...

表 4 4 种牙周致病菌对 c-HA 的黏附量

Tab 4 Adhesion scores of four periodontal pathogens attaching to c-HA

牙周致病菌	阳性对照组	阴性对照组	未加具核梭杆菌组	加入具核梭杆菌组
具核梭杆菌	56.89±13.67	29.0±4.04	44.11±7.70	39.89±6.74
牙龈卟啉单胞菌	11 070.00±140.49	29.0±4.04	5 892.15±269.82	7 270.07±338.90
中间普雷沃菌	337.89±20.40	29.0±4.04	154.11±3.08	186.67±17.32
伴放线嗜血杆菌	29 019.00±301.19	29.0±4.04	1 988.47±203.61	4 043.82±374.52

表 5 4 种牙周致病菌对 c-HA 的黏附率

Tab 5 Adhesion percentage of four periodontal pathogens attaching to c-HA % , $\bar{x}\pm s$

牙周致病菌	未加具核梭杆菌组	加入具核梭杆菌组	P值
具核梭杆菌	55.33±4.99	39.83±3.40	0.011
牙龈卟啉单胞菌	53.08±1.74	65.61±3.89	0.007
中间普雷沃菌	40.67±3.04	50.88±3.02	0.015
伴放线嗜血杆菌	6.77±0.79	13.86±1.44	0.002

3 讨论

几乎所有的人类口腔细菌都有共聚作用，即基

因不同的细菌间的相互识别由植物凝集素样物质和碳氢化合物相互作用所介导^[1-2]。口腔微生物之间的共聚关系具有明显的属种特异性，并有一定的规律性。其一，通常早期定植微生物仅与早期定植微生物和具核梭杆菌共聚，晚期定植微生物则只与具核梭杆菌共聚^[1]；其次，梭杆菌属几乎能与所有口腔微生物共聚^[3-5]。体内试验证实，具核梭杆菌在健康部位和牙周炎部位均有较高的检出率。在菌斑形成过程中，从早期到晚期，随着菌斑形成具核梭杆菌成比增加^[12]。在经过 7 d 形成的牙菌斑生物膜中占 20% 以上^[13]。具核梭杆菌也是牙周袋内的优势菌^[9]。牙周炎患者的具核梭

杆菌分离率明显高于健康者^[10]。在活动性牙周病灶中，具核梭杆菌的检出量高于非活动性牙周病灶^[11]，检出率随牙周组织破坏的加重而增高；因此，具核梭杆菌不仅从致病作用的角度值得研究，而且在菌斑形成中的作用也值得探讨。这也是本课题选择具核梭杆菌作为研究对象的原因。

本试验中，具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌彼此之间都有共聚作用，具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌以及牙龈卟啉单胞菌与中间普雷沃菌间的共聚度均可达到 4 度，具核梭杆菌与其他 3 种细菌间的共聚度均>3 度，且四菌之间的共聚度在 30 min 时基本达到最大值。陆卫青等^[6]研究了具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、变异链球菌、血链球菌和黏性放线菌之间的共聚关系，结果显示，具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌、变异链球菌和血链球菌皆有共聚作用，与福赛斯坦纳菌和黏性放线菌无共聚作用，且具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌间的共聚度为 4 度。本试验结果与之相似。由表 1、2 和 3 可见，具核梭杆菌与其他细菌的共聚度较牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、伴放线嗜血菌各自与其他细菌的共聚度大。由此是否可从菌斑形成能力的角度解释具核梭杆菌在牙周健康和牙周炎部位菌斑中的高检出率，具核梭杆菌是否作为共聚桥介导牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌等晚期定植菌在龈下菌斑中定植起重要作用，以上问题值得探讨。

胶原是牙本质和牙骨质最主要的有机成分^[7]，除了 HA，牙根表面牙骨质质量分数的 50% 以上是胶原蛋白。本试验利用牛型 c-HA 模拟人工牙根表面，所用的 HA 微珠表面积小，沉降迅速，容易与未附着的细菌分开^[8]。为排除细菌在 HA 微珠表面的非特异性吸附，用牛血清清蛋白阻塞 HA 上未被胶原覆盖的裸露部分。本试验牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌在具核梭杆菌先黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在具核梭杆菌未黏附时的黏附率的结果，可能缘于占据人工牙根面的具核梭杆菌对牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和伴放线嗜血菌有较高的凝聚作用，即后三者通过具核梭杆菌的共聚作用间接附着于人工牙根面的数量大于以上细菌直接黏附于人工牙根面；但是，具核梭杆菌是否在体内介导了其他三菌对根面的黏附和龈下菌斑中的定植，仍待进一步的证实。

具核梭杆菌在具核梭杆菌未黏附的状况下对 c-HA 的黏附率高于其在具核梭杆菌先黏附时的黏附率提示：具核梭杆菌同种属之间自身共聚作用较少。

4 参考文献

- [1] Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, et al. Coaggregation :Specific adherence among human oral plaque bacteria[J]. FASEB J, 1993, 7(5) :406-413.
- [2] Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque[J]. Annu Rev Microbiol, 1988, 42 :627-656.
- [3] Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria[J]. Infect Immun, 1989, 57(10) :3194-3203.
- [4] Takemoto T, Hino T, Yoshida M, et al. Characteristics of multimodal co-aggregation between *Fusobacterium nucleatum* and streptococci[J]. J Periodontol Res, 1995, 30 (4) :252-257.
- [5] Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, et al. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(5) :1464-1468.
- [6] 陆卫青, 李德懿. 核梭杆菌与其他口腔细菌共聚及共聚抑制[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(4) :227-229.
- [7] Sandholm L. Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease[J]. J Clin Periodontol, 1986, 13(1) :19-26.
- [8] 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.
- [9] Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases[J]. Periodontol 2000, 1994, 5 :66-77.
- [10] Savitt ED, Socransky SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions [J]. J Periodontol Res, 1984, 19(2) :111-123.
- [11] Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, et al. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions[J]. J Clin Periodontol, 1985, 12(8) :648-659.
- [12] Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque[J]. Arch Oral Biol, 1967, 12(12) :1561-1568.
- [13] Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, et al. The *in vivo* dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence *in situ* hybridization[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 5) :681-687.

(本文编辑 汤亚玲)