

高原地区与平原地区慢性牙周炎患者龈下菌斑中牙周致病菌差异的初步研究

刘莉 吕俊 谭颖徽 张纲

第三军医大学新桥医院口腔科 重庆 400037

[摘要] 目的 分析高原地区与平原地区慢性牙周炎患者龈下菌斑中牙周致病菌的差异。方法 应用以16S rRNA为基础的聚合酶链反应(PCR)技术,检测高原、平原地区的慢性牙周炎(CP)患者和牙周健康(PH)者龈下菌斑中6种牙周可疑致病菌,包括牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)、福赛坦氏菌(*T. forsythia*)、齿垢密螺旋体(*T. denticola*)、伴放线放线杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)、中间普氏菌(*P. intermedia*)和具核梭杆菌(*F. nucleatum*)。结果 高原CP组*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*检出率分别为:90%、100%、80%、60%、85%、85%,明显高于PH组($P<0.05$);平原CP组*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*检出率分别为80%、85%、70%、75%、50%,明显高于PH组($P<0.05$);*F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans*在高原CP组的检出率高于平原CP组($P<0.05$)。结论 6种细菌在高原CP患者龈下菌斑中均有较高检出率;高原地区与平原地区CP患者龈下菌斑中*F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans*检出率有明显差异。

[关键词] 高原;牙周炎;龈下菌斑;牙周致病菌

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2014.02.008

Difference in the periodontal pathogens in the subgingival plaque of periodontitis patients living in high-altitude and plain areas Liu Li, Lü Jun, Tan Yinghui, Zhang Gang. (Dept. of Stomatology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** This study was designed to investigate the differences among six periodontal pathogens from the subgingival plaque of chronic periodontitis(CP) patients living in high-altitude and plain areas. **Methods** Subgingival plaque samples were collected from 20 CP patients and 20 periodontal healthy(PH) subjects living in high-altitude or plain areas. Six periodontal pathogens, which includes *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia*(*T. forsythia*), *Treponema denticola*(*T. denticola*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*(*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*), and *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*), were detected by 16S rRNA polymerase chain reaction. **Results** *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum* were detected more frequently in high-altitude CP patients(with corresponding prevalence rates of 90%, 100%, 80%, 60% and 85%) compared with high-altitude PH controls($P<0.05$). *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum* were detected more frequently in plain CP patients(with corresponding prevalence rates of 80%, 85%, 70%, 75% and 50%) than plain PH controls($P<0.05$). The detection rates of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in the high-altitude CP group were significantly higher than those in the plain CP group($P<0.05$). **Conclusion** The high-altitude CP group showed the highest detection rates for the six periodontal pathogens than the other groups. Significant differences were

[收稿日期] 2013-08-15; **[修回日期]** 2013-12-20

[基金项目] 全军医药卫生科研基金“十一五”资助项目(06MA184);
全军医药卫生科研基金“十二五”资助项目(CWS12J096)

[作者简介] 刘莉, 硕士, Email: 286109554@qq.com

[通讯作者] 张纲, 副主任医师, 博士, Email: xqykqk@163.com

found in the prevalence of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* between the high-altitude and plain CP groups.

[Key words] high altitude; periodontitis; subgingival plaque; periodontal pathogens

牙周病是人类失牙的主要原因。慢性牙周炎 (chronic periodontitis, CP) 是细菌及其产物引起的慢性感染性疾病, 表现为牙龈出血、牙周袋形成和牙槽骨吸收。牙周微生物是慢性牙周炎发生的始动因子, 有学者曾在牙龈沟内发现325种细菌。

目前证实与牙周炎发生有关的可疑致病菌有十余种。久居于高原者, 其牙周炎的患病率明显高于其他地区, 高达70.2%^[1]。这可能是由于高原特殊环境尤其是缺氧环境对全身代谢和免疫、牙周组织、厌氧菌的生长和繁殖等均有影响引起的。高原地区公认的牙周致病菌和平原地区有何差异尚未见报道。

本研究通过调查高原、平原地区CP患者和牙周健康 (periodontal healthy, PH) 者龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)、福赛坦氏菌 (*Tannerella forsythia*, *T. forsythia*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*, *T. denticola*)、伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*)、中间普氏菌 (*Prevotella intermedia*, *P. intermedia*) 和具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 的检出率, 分析高原与平原地区慢性牙周炎牙周致病菌的差异, 初步探讨高原牙周炎的发病机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

在第三军医大学新桥医院口腔科门诊 (海拔500 m) 和西藏林周县人民医院口腔科门诊 (海拔3 800 m) 分别对受检者进行牙周健康调查, 选取在当地居住时间超过1年的CP患者和PH者各20例。CP的诊断严格遵循1999年国际牙周病分类研讨会制定的标准^[2]。具体纳入标准如下。

CP组: 1) 年龄20~60岁; 2) 每个象限至少有2个位点探诊深度 ≥ 5 mm, 附着丧失 ≥ 1 mm; 3) 余留牙数不少于20颗, 牙槽骨吸收超过根长2/3的牙齿 ≤ 8 颗。PH组: 1) 年龄20~60岁; 2) 全口牙周检查探诊深度 ≤ 3 mm, 无附着丧失; 3) 出血指数 ≥ 2 的位点不超过10%。排除标准: 1) 有系统性疾病; 2) 妊娠期女性或服用避孕药的女性; 3) 最近半年曾行牙周基础治疗, 或2周内服用过抗生素; 4) 急慢性涎腺炎或涎腺结石患者;

5) 口腔黏膜病患者。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要实验材料与仪器

标准菌株 (口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学), 细菌基因组DNA提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 引物 (上海捷瑞生物工程有限公司), KPWHO牙周袋刻度探针 (上海康桥齿科医械厂), PTC-100型聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪 (BIO-RAD公司, 美国), 自动凝胶成像分析仪 (安莱公司, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 检查方法 自然光线下, 用平面口镜、牙周袋刻度探针和普通探针, 以视诊结合探诊的方式对受检者进行牙周检查。

取全口4个象限的第一、二磨牙和右侧上颌中切牙、左侧下颌中切牙为指数牙, 记录其菌斑指数、牙龈出血指数、探诊深度等牙周临床检查指标。所有CP患者均拍摄全口根尖片, 证实其存在邻面牙槽骨的吸收。牙周袋深度、附着丧失诊断标准均参照第三次全国口腔健康流行病学调查标准^[3]。

1.3.2 样本采集和处理 无菌棉球隔湿之后, 去除牙齿表面的龈上菌斑和牙结石, 用无菌刮匙于牙周袋底刮取龈下菌斑, 放入EP管内, 高速离心后, 取沉淀用细菌基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。

1.3.3 引物合成与PCR检测 6种细菌的引物来自编码16S rRNA的基因 (具体引物序列及扩增片段见表1), 用PCR扩增仪对龈下菌斑细菌基因组DNA进行PCR扩增, 取扩增产物, 以6种国际参考标准菌株即*P. gingivalis* (ATCC 33277)、*A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523)、*T. denticola* (ATCC 43037)、*F. nucleatum* (ATCC 25586)、*P. intermedia* (ATCC 25611)、*T. forsythia* (ATCC 43037) 为阳性对照, 变异链球菌 (ATCC 27607) 为阴性对照, 100 V电压下2%琼脂糖凝胶电泳50 min后, 以DNA Marker DL1000为DNA相对分子质量标准, 紫外线检测仪下观察扩增带。

1.4 统计学分析

使用SPSS 13.3统计软件, 计量资料采用独立样本*t*检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 6种细菌的特异性引物序列

Tab 1 The primer sequence of 6 kinds of bacterium

细菌种类	序列 (5'→3')	预期产物长度/bp
<i>P. gingivalis</i>	上游:AGGCAGCTTGCCATACTGCG 下游:ACTGTTAGCAACTACCGATGT	412
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	上游:ATGCCAAATTGACGTTAAAT 下游:AAACCCATCTCTGAGTCTTCTTC	557
<i>T. denticola</i>	上游:TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT 下游:TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTCTTA	316
<i>F. nucleatum</i>	上游:GGCCACAAGGGGACTGAGACA 下游:TTAGCCGTCACCTCTTCTGTGG	161
<i>P. intermedia</i>	上游:CGTGGACCAAGATTCATCGGTGGA 下游:CCGCTTACTCCCAACAAA	267
<i>T. forsythia</i>	上游:GCGTATGTAACCTGCCCGCA 下游:TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	641

2 结果

2.1 PCR产物电泳结果

以DNA Marker DL1000为DNA相对分子质量标准, 6种国际参考标准菌株为阳性对照, 变异链球菌为阴性对照, 将各组龈下菌斑致病菌PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在412 bp处可检测到*P. gingivalis*目的片段, 在557 bp处可检测到*A.*

*actinomycetemcomitans*目的片段, 在316 bp处可检测到*T. denticola*目的片段, 在161 bp处可检测到*F. nucleatum*目的片段, 在267 bp处可检测到*P. intermedia*目的片段, 在641 bp处可检测到 *T. forsythia*目的片段。

2.2 6种微生物在高原CP组、PH组和平原CP组、PH组的检出率比较

6种微生物在各组的检出率见表2。

表 2 6种微生物在各组的检出情况

Tab 2 Detection rate of six microorganisms

n/%

微生物种类	高原CP组	高原PH组	平原CP组	平原PH组
<i>P. gingivalis</i>	18/90**	9/45	16/80**	5/25
<i>T. forsythia</i>	20/100**	8/40	17/85**	6/30
<i>T. denticola</i>	16/80**	5/25	12/70**	2/10
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	12/60*	3/15	1/5	0/0
<i>P. intermedia</i>	16/85**	6/30	15/75**	3/15
<i>F. nucleatum</i>	16/85*	7/35	11/50	0/0

注: **A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum*在高原CP组的检出率与其余各组比较, 其差异有统计学意义 ($P<0.05$); ***P. gingivalis*、*T. forsythia*、*P. intermedia*、*T. denticola*在高原、平原CP组的检出率与PH组比较, 其差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

P. gingivalis、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*在高原CP组的检出率分别为: 90%、100%、80%、60%、85%、85%, 明显高于PH组 ($P<0.05$); *P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*在平原CP组的检出率分别为80%、85%、70%、75%、50%, 明显高于PH组 ($P<0.05$); *F.*

nucleatum、*A. actinomycetemcomitans*在高原CP组的检出率分别为85%、60%, 明显高于平原CP组 ($P<0.05$)。

3 讨论

中国高原人口众多, 牙周炎患病率呈上升趋势。高原地区的大气压低、氧分压低、气温低、

昼夜温差大、风沙大、紫外线辐射强,可能导致局部牙周组织缺氧。研究表明,牙周组织的氧含量会影响微生物的增殖和分布,菌群数量和种类的改变可能在一定程度上加速高原牙周炎的发生发展。

局部细菌感染是牙周炎发生发展的始动因素。目前已知的牙周可疑致病菌包括:*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*等。动物实验发现,高原与平原牙周炎牙周致病菌的数量和种类的分布存在明显差异,关于高原CP患者牙周致病菌的研究尚未见报道。在牙周炎致病菌检测方法中,PCR方法具有特异性高、敏感性强的特点,尤其适合培养条件要求苛刻的厌氧菌的检测,所以我们使用PCR方法检测高原与平原CP患者和PH者龈下菌斑中*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*和*F. nucleatum*的检出率。

*P. gingivalis*是公认的重要牙周致病菌,牙周炎症位点所占比例增加时,龈下菌斑中检出*P. gingivalis*的机率也相应增加。研究^[4]表明,*P. gingivalis*、*T. forsythia*和*T. denticola*的组合,又称“红色复合体”,与牙周袋深度、探诊出血密切相关,在牙周炎发生发展中具有显著的毒力和致病性,能通过多种机制干扰宿主的防御能力,具有引发牙周破坏的潜能。*F. nucleatum*既是龈下菌斑中优势菌也是牙周袋内的主要致病菌之一,Shin等^[5]在对健康者、牙龈炎和牙周炎患者的龈下或牙周袋中的细菌培养时发现,牙龈炎和牙周炎的患者*F. nucleatum*检出率明显高于健康者,其检出率与牙周组织破坏程度正相关。本研究结果提示,*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*P. intermedia*和*F. nucleatum*在平原CP患者龈下菌斑中均为优势菌,与以往研究结果一致;在高原CP组,*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*均有较高检出率,其中*F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans*检出率明显高于平原CP组。

高原环境主要生理特点是低氧环境下机体血流中血红蛋白增多,血液黏稠度增高,微循环代谢缓慢甚至障碍。而牙周组织供氧减少和牙周组

织无氧代谢增加,pH值下降等,可能导致厌氧菌的种类、构成、甚至其毒力因子发生改变,以致加剧牙周组织病变的发生发展。本研究结果中,高原CP组龈下菌斑中*F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans*阳性检出率分别为80%、60%,显著高于其他3组,其原因可能是*F. nucleatum*可以在pH5.0~7.0的较宽范围内生存。研究提示,*F. nucleatum*可产生有机酸和氨,使菌斑环境接近中性,改变局部pH值利于其生长和繁殖,而高原环境可能比平原环境更有利于*F. nucleatum*的生长。有学者报道,局限型侵袭性牙周炎患者96.5%检出*A. actinomycetemcomitans*阳性,非局限型侵袭性牙周炎患者15.2%检出*A. actinomycetemcomitans*阳性。本研究结果显示,高原及平原CP组*A. actinomycetemcomitans*的阳性检出率明显低于同组其他5种牙周致病菌,其原因可能与研究对象多为非局限性侵袭性牙周炎患者有关,但高原CP组*A. actinomycetemcomitans*的阳性检出率明显高于其他3组,其具体机制仍需进一步研究。以上研究结果提示,高原特殊环境可能导致CP患者牙周致病菌优势菌群发生改变。

4 参考文献

- [1] 肖娴,张纲,高钰琪,等.驻高原和平原官兵口腔健康状况现状调查[J].解放军预防医学杂志,2010,28(1):40-41.
- [2] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions[J]. Ann Periodontol, 1999, 4(1):1-6.
- [3] 全国牙病防治指导组.第三次全国口腔健康流行病学抽样调查方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:28.
- [4] Socransky SS, Haffajee AD, Patel MR, et al. Microbial complexes in supragingival plaque[J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(3):196-205.
- [5] Shin J, Kho SA, Choi Y, et al. Antibody and T cell responses to *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* in health and chronic periodontitis[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e53703.

(本文编辑 骆筱秋)