

[文章编号] 1674-8115(2011)07-1047-03

• 短篇论著 •

牙周治疗对龈下菌斑中古细菌定植的影响

李超伦, 刘大力, 钱洁蕾, 周彦玢, 束 蓉

(上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周科 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

[摘要] **目的** 研究牙周治疗对龈下菌斑中古细菌定植的影响。**方法** 对49例中重度牙周炎患者的牙周治疗进程进行跟踪, 分别于龈上菌斑刮除后(基线)、牙周基础治疗后4周和牙周翻瓣术后12周, 采集龈下菌斑标本抽提DNA, 利用古细菌16S rRNA基因通用引物进行PCR, 对各菌斑标本古细菌16S rRNA表达进行定性检测, 确定阳性标本并计算古细菌检出率。采用Real-Time PCR技术对阳性标本中总细菌和古细菌16S rRNA基因进行定量检测, 计算古细菌相对丰度。**结果** 牙周翻瓣术后12周时龈下菌斑标本中的古细菌检出率和古细菌相对丰度分别为17.6%和0.58%, 显著低于基线时的69.4%和2.32%及牙周基础治疗后4周时的57.1%和2.30%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 龈下菌斑中古细菌的定植情况伴随牙周治疗的进程而迅速降低, 提示菌斑厌氧环境的改变是影响古细菌定植的关键因素。

[关键词] 牙周炎; 古细菌; 定植; 龈下菌斑

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.039

[中图分类号] R781.4

[文献标志码] B

Effects of periodontal therapy on *Archaea* colonization in subgingival plaque

LI Chao-lun, LIU Da-li, QIAN Jie-lei, ZHOU Yan-bin, SHU Rong

(Department of Periodontics, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of periodontal therapy on *Archaea* colonization in subgingival plaque. **Methods** The periodontal treatment process of 49 patients with moderate to severe periodontitis were followed up, and subgingival plaque samples were collected after supragingival plaque scaling (baseline), 4 weeks after periodontal basic treatment and 12 weeks after periodontal flap surgery for DNA extraction. PCR was performed with 16S rRNA gene of *Archaea*, and the expression of 16S rRNA of *Archaea* in plaque samples was qualitatively detected. The positive samples were determined, and the detection rate of *Archaea* was calculated. Real-Time PCR was employed to quantitatively detect the 16S rRNA gene of total bacteria and *Archaea* in positive samples, and the relative abundance of *Archaea* was calculated. **Results** The detection rates of *Archaea* and relative abundance of *Archaea* in subgingival plaque samples 12 weeks after periodontal flap surgery were 17.6% and 0.58% respectively, which were significantly lower than those at baseline (69.4% and 2.32%) and 4 weeks after periodontal basic treatment (57.1% and 2.30%) ($P < 0.05$). **Conclusion** The *Archaea* colonization in subgingival plaque rapidly decreases with the periodontal treatment process, which indicates that the subgingival anaerobic environment is the key factor for *Archaea* colonization.

[Key words] periodontitis; *Archaea*; colonization; subgingival plaque

慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)是多种微生物感染导致的慢性炎症性疾病,其发病与厌氧微生物的混合感染相关^[1]。牙周炎患者龈下菌斑中定植的微生物群落在牙周袋微环境中相互影响,使用现有的实验室技术仅能够培养其中50%~60%的微生物物种^[2],对于其他未获培养微生物的认识主要

依靠分子生物学手段来实现^[3]。

生物分为真核生物、真细菌和古细菌3大类群,自然界和人体内广泛分布的古细菌在人类疾病发生和发展中的作用逐渐被人们所认识^[4]。牙菌斑、感染根管、胃肠道、生殖道等都是古细菌定植的环境^[5-8];但有限的研究尚无法证实古细菌是牙周致病

[基金项目] 国家自然科学基金(30700945)和上海市重点学科建设项目(S30206)(National Natural Science Foundation of China, 30700945; Shanghai Key Discipline Construction Project, S30206)。

[作者简介] 李超伦(1972—),男,主治医师,博士;电子信箱:lichaojun@21cn.com。

[通信作者] 束 蓉,电子信箱:shurong123@hotmail.com。

微生物^[9,10]。

我们先前的研究^[8]已发现慢性牙周炎患者龈下菌斑中的古细菌主要分布在探诊深度(probing depth, PD) ≥ 5 mm 的牙周环境中,与慢性牙龈炎的生态条件比较,其检出率和定植的基因数量均较高^[9]。本研究通过对慢性牙周炎治疗过程不同阶段的龈下菌斑中古细菌进行定性和定量检测分析,进一步探讨古细菌群落在牙周炎进程中的作用。

1 对象与方法

1.1 病例选择

选择在上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周科门诊接受牙周病序列治疗的 49 例中重度慢性牙周炎患者作为研究对象。入选者口腔中存在有保留价值且 PD ≥ 5 mm 的患牙,3 个月内无服用抗生素史,否认系统性疾病史;签署知情同意书后进入研究程序。

1.2 临床指标记录和采样

记录入选者的基本信息和病史。治疗前记录基线的 PD 和附着丧失(attachment loss, AL)等临床指标。入选患牙经刮除龈上菌斑后,用无菌 Gracey 刮治器刮取牙周袋底的龈下菌斑,标本立即转入含磷酸盐缓冲液的离心管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存;分别在接受牙周基础治疗后 4 周和牙周翻瓣术后 12 周,再次记录临床指标,同法采集龈下菌斑标本。

1.3 古细菌 16S rRNA 基因的定性和定量检测

1.3.1 定性检测 菌斑标本抽提 DNA 的操作步骤参照先前研究^[9];针对古细菌 16S rRNA 基因设计通用引物 ArchS15 (5'-TCCAGGCCCTACGGG-3') 和 ArchA19 (5'-YCCGGCGTTGAMT CCAATT-3'),产物大小 607 bp^[7,10];PCR 反应条件参见文献^[7]。在设定好阳性对照和阴性对照的反应结束后,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察目标片段,记录标本的阳性结果,计算古细菌检出率。

1.3.2 定量检测 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TaKaRa, 大连)回收纯化目标片段,将获得的古细菌 16S rRNA 基因片段扩增产物作为标准品,使用 ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, 美国) DNA 定量仪测定标准品 DNA 的浓度和纯度;以经过倍比稀释的标准品制作 Real-Time PCR 定量标准曲线。收集定性检测为阳性的标本,使用 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, 美国),经 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, 大连)进行 Real-Time PCR 定量检测。每个标本检测 3 复孔,20 μL 反应体系:含 2 μL DNA 模板,浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各

0.4 μL , 10 μL SYBR Green PCR Master Mix。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环;最后是常规溶解曲线分析。随机软件 Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software 根据标准曲线由复孔数据自动给出拷贝数均值。同法使用细菌通用引物 EuF (5'-TCCTACGGGAGGCAGCACT-3') 和 EuR (5'-GGACTACCAGGG TATCTAATCCTGTT-3') 进行同一标本的总细菌 16S rRNA 的定量检测。以标准品的浓度换算出每微克 DNA 中古细菌和总细菌的绝对数量,计算古细菌的相对数量比值(相对丰度)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。牙周治疗不同阶段的古细菌检出率比较采用 χ^2 检验分析。将定量检测获得的基线和各治疗阶段完成后患者龈下菌斑标本中古细菌和总细菌 16S rRNA 基因拷贝数均值进行对数转换,采用 t 检验对牙周治疗不同阶段的定量结果和古细菌相对丰度进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙周袋 PD 和古细菌检出率比较

49 例中重度慢性牙周炎患者基线和牙周治疗不同阶段的牙周袋 PD 和龈下菌斑中古细菌检出率见表 1。统计学分析结果显示:基线和基础治疗后 4 周时的牙周袋 PD 和龈下菌斑中古细菌检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与基线和基础治疗后 4 周时比较,牙周翻瓣术后 12 周时牙周袋 PD 显著变浅,龈下菌斑中古细菌检出率明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 牙周治疗不同阶段牙周袋 PD 及龈下菌斑中古细菌检出率比较 ($n = 49$)

Tab 1 Detection rates of *Archaea* in periodontal pocket PD and subgingival plaque at different stages of periodontal therapy ($n = 49$)

指标	基线	基础治疗后 4 周	牙周翻瓣术后 12 周
PD 均值/mm	7.0	5.9	2.6 ^①
古细菌检出例数	34	28	6
古细菌检出率/%	69.4	57.1	17.6 ^①

① $P < 0.05$ 与基线和基础治疗后 4 周比较。

2.2 古细菌 16S rRNA 基因定量及相对丰度比较

古细菌阳性标本中总细菌和古细菌 16S rRNA 基因的定量数据及古细菌相对丰度见表 2。统计学分析结果显示:牙周治疗结束后,总细菌 16S rRNA 基因拷贝数对数均值有所降低,但与基线数据比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与基线和基础治

疗后4周时比较,牙周翻瓣术后12周时古细菌16S rRNA基因拷贝数对数均值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);基线与基础治疗后4周时16S rRNA基因拷贝数对数均值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与基线和基础治疗后4周时比较,牙周翻瓣术后12周时古细菌相对丰度均值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 牙周治疗不同阶段古细菌和总细菌16S rRNA基因定量及古细菌相对丰度比较

Tab 2 Quantification of 16S rRNA gene of *Archaea* and total bacteria and relative abundance of *Archaea* at different stages of periodontal therapy

指标	基线 ($n=34$)	基础治疗后 4周($n=28$)	牙周翻瓣术后 12周($n=6$)
总细菌16S rRNA基因定量	4.51 ± 0.59	4.31 ± 0.57	4.14 ± 0.31
古细菌16S rRNA基因定量	2.76 ± 0.74	2.75 ± 0.45	1.64 ± 0.54^{①}
古细菌相对丰度均值	2.32%	2.30%	0.58% ^①

① $P < 0.05$ 与基线和基础治疗后4周比较。

3 讨论

古细菌可以在多种极端自然环境包括高温、高酸碱度、高盐、严格无氧等条件下生存^[11]。较浅牙周袋的有氧环境可能并不是古细菌的理想生存空间;先前的横断面调查^[8]发现中国成人牙周袋内古细菌的检出率伴随牙周探诊深度的增加而增高,PD ≥ 7 mm的牙周袋内81.8%存在古细菌,PD为5~6 mm的牙周袋内古细菌检出率为63.2%,而PD为3~4 mm的牙周袋内有古细菌分布阳性者仅为13.3%,PD ≤ 2 mm的牙周袋则无古细菌检出^[8]。其他地域人群的研究^[10,12]结果显示:慢性牙周炎患者患病位点的古细菌检出率为76.6%~77.0%,健康对照组中则未检出古细菌。本研究中,慢性牙周炎患者未接受治疗前的牙周袋内(PD ≥ 5 mm)古细菌的检出率为69.4%,与其他相关研究的结果相符。

本研究观察不同牙周治疗阶段古细菌在龈下菌斑中定植的情况,结果发现经过牙周基础治疗,PD均值由基线的7.0 mm降低到5.9 mm,而古细菌的检出率也降低到57.1%,但与基线数据比较差异并无统计学意义;而牙周翻瓣术后12周,PD均值进一步降低到2.6 mm,古细菌检出率降为17.6%,与基线和基础治疗后的情况比较差异均有统计学意义。结合先前研究^[8]数据进行分析,可以推断牙周袋的厌氧环境是古细菌生存的关键,牙周治疗实现的牙周袋PD的降低是清除牙周可疑致病微生物的关键。

前期的研究^[9]发现:牙周炎组与龈缘炎组间古

细菌绝对定量的差异有统计学意义,说明古细菌在两种疾病发生时的感染强度不同。本研究采用相对定量的方法判断古细菌在牙周治疗过程中的变化情况,结果发现基础治疗对龈下菌斑微生物群落中古细菌的影响不大,而翻瓣手术后为数不多的古细菌阳性位点中,细菌的总量变化不明显,但古细菌的相对丰度显著降低,同样支持非厌氧环境的产生是抑制古细菌的主要因素。

本研究通过追踪牙周治疗过程中慢性牙周炎患者龈下菌斑中古细菌的定植情况,获得了古细菌在牙周病进程中的感染率及感染强度信息,证实古细菌的存在主要由牙周厌氧环境所决定,创造牙周的非厌氧环境是清除古细菌这种与牙周炎发病可能相关微生物的有效方法。

【参考文献】

- [1] Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases[J]. Periodontology, 2000, 1994, 5: 66-77.
- [2] Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis[J]. Periodontol 2000, 2010, 53: 70-88.
- [3] Li CL, Liang JP, Jiang YT. Association of uncultivated oral phylotypes AU126 and X112 with periodontitis[J]. Oral Dis, 2006, 12(4): 371-374.
- [4] Olsen GJ, Woese CR. Archaeal genomics: an overview[J]. Cell, 1997, 89(7): 991-994.
- [5] Brusa T, Conca R, Ferrara A, et al. Presence of methanobacteria in human subgingival plaque[J]. J Clin Periodontol, 1987, 14(8): 470-471.
- [6] Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 79.
- [7] Li CL, Liu DL, Jiang YT, et al. Prevalence and molecular diversity of *Archaea* in subgingival pockets of periodontitis patients[J]. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24(4): 343-346.
- [8] 李超伦,姜云涛,梁景平,等.牙周病患者龈下菌斑中古细菌的分布[J].上海交通大学学报:医学版,2007,27(2): 652-654.
- [9] 李超伦,姜云涛,张明珠,等.古细菌在牙周病龈下菌斑中的定性和定量分析[J].中华口腔医学杂志,2008,43(10): 589-591.
- [10] Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CG, et al. Methanogenic *Archaea* and human periodontal disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(16): 6176-6181.
- [11] DeLong EF. Archaeal mysteries of the deep revealed[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(17): 6417-6418.
- [12] Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, et al. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 196(2): 129-133.

【收稿日期】2011-03-14

【本文编辑】王淑平