

伴冠心病的慢性牙周炎患者龈下菌斑中牙周致病菌的检测

吕罕鲜, 张明珠, 吴剑花, 和丽佳, 雷雅燕
(昆明医学院附属口腔医院, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 观察伴冠心病 (coronary heart disease, CHD) 的慢性牙周炎患者与慢性牙周炎患者 (chronic periodontitis, CP) 龈下菌斑中牙周致病菌的分布. **方法** 收集 50 例 CP 患者及 50 例 CP 合并 CHD 患者的龈下菌斑, 提取细菌 DNA 以巢氏聚合酶链反应 (nested polymerase chain reaction, Nested PCR) 法检测菌斑中牙龈卟啉单胞菌 (porphyromonas gingivalis, Pg)、中间普氏菌 (prevotella intermedia, Pi)、具核梭杆菌 (fusobacterium nucleatum, Fn)、伴放线放线杆菌 (actinobacillus actinomycetemcomitans, Aa)、福赛斯坦纳菌 (tannerella forsythensis, Tf)、齿垢密螺旋体 (treponema denticola, Td), 并比较 6 种微生物在 CP 及 CP 合并 CHD 患者物龈下菌斑中的检出率. **结果** CP 组细菌检出率为: Pg 98%, Pi 92%, Fn 88%, Aa 6%, Tf 92% 和 Td 98%; CP 合并 CHD 组细菌检测出率为: Pg 100%, Pi 94%, Fn 80%, Aa 14%, Tf 96% 和 Td 98%, 2 组间 6 种牙周可疑致病菌检出率差别无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** CP 组及 CP 合并 CHD 组的龈下菌斑中 6 种牙周可疑致病菌的分布无明显差别.

[关键词] 牙周致病菌; 慢性牙周炎; 冠心病; PCR

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 02 - 0088 - 05

Detection of Periodontopathogens in Subgingival Plaque of Patients with Coronary Heart Disease and Periodontitis

LV Han - xian, ZHANG Ming - zhu, WU Jian - hua, HE Li - jia, LEI Ya - yan
(The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the prevalence and distribution of periodontopathogens in the subgingival plaque of patients with coronary heart disease (CHD) and periodontitis. **Methods** 50 subgingival plaque samples of patients with CP and 50 subgingival plaque samples of patients with CP and CHD were collected and their bacteria DNA was extracted. Six periodontal pathogens including Porphyromonas gingivalis (Pg), Prevotella intermedia (Pi), Fusobacterium nucleatum (Fn), Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa), Tannerella forsythensis (Tf) and Treponema denticola (Td) were detected by the Nested polymerase chain reaction (Nested PCR). **Results** In the CP group, the rates of periodontal bacteria were Pg 98%, Pi 92%, Fn 88%, Aa 6%, Tf 92% and Td 98%; In the CP combined with CHD group, the rates of periodontal bacteria were Pg 100%, Pi 94%, Fn 80%, Aa 14%, Tf 96% and Td 98%. **Conclusion** The distribution of putative periodontopathogens Pg, Pi, Fn, Aa, Tf and Td is similar in the CP group and CP combined with CHD group.

[Key words] Periodontal pathogens; Chronic periodontitis; Coronary heart disease; Polymerase chain reaction

研究资料表明炎症和感染与冠心病的发生发展关系密切, 特别是牙周炎可能是冠心病的危险因素

之一^[1]. 牙周炎的始动因素是牙菌斑, 细菌的成分及代谢产物直接破坏牙周组织并可引起局部和全身

[基金项目] 云南省科技厅省校联合专项基金资助项目 (2008CD057)

[作者简介] 吕罕鲜 (1986~), 女, 江苏滨海县人, 在读硕士研究生, 主要从事口腔疾病临床工作.

[通讯作者] 雷雅燕. E-mail: yayanlei@yahoo.com.cn

的免疫和炎症反应。本研究使用 PCR 方法对 CP 组及 CP 合并 CHD 组患者的龈下菌斑进行牙周可疑致病菌的检测, 为 2 者的相关性研究提供证据。

1 材料与方法

1.1 病例选择及标准

选择在昆明医学院第一附属医院心内科确诊为冠状动脉心脏病、同时患慢性牙周炎患者 50 例(包括轻度 10 例, 中度 19 例, 重度 21 例), 其中男性 41 例, 女性 9 例, 年龄范围 40~74 岁, 平均 59 岁; 慢性牙周炎患者 50 例(包括轻度 10 例, 中度 19 例, 重度 21 例), 其中男性 35 例, 女性 15 例, 年龄范围 26~76 岁, 平均 54 岁; 所有研究对象均知情同意。

冠心病纳入标准^[2]: 冠脉造影判断阳性标准: 前降支、回旋支、右冠脉或左主干存在 $\geq 50\%$ 直径的固定性狭窄或阻塞性病变。

慢性牙周炎的纳入标准^[3]: 有明显的菌斑、牙石及局部刺激因素; 牙龈的炎症; 牙周袋深度

(PD) ≥ 4 mm, 附着丧失 (AL) ≥ 1 mm。

慢性牙周炎的排除标准: (1) 侵袭性牙周炎; (2) 有全身系统性疾病; (3) 近 1 个月内使用过抗生素或近 1 年内接受牙周治疗者。

牙周炎程度: 轻度 (AL 1~2 mm)、中度 (AL 3~4 mm) 和重度 (AL ≥ 5 mm)。

1.2 主要试剂、仪器

本研究采用 6 种国际参考标准菌株 (四川大学华西口腔医院微生物实验室提供), 分别为 Pg ATCC33277、Pi ATCC 25611、Aa ATCC 29522、Fn ATCC25586)、Tf ATCC43037 和 Td ATCC33521。T-IANamp Bacteria DNA kit (天根生化科技北京有限公司)。dNTP Mixture、Pyrobest DNA Polymerase、10×PCRBuffer、6×Loading Buffer (TaKaRa 宝生物工程大连有限公司)。100 bpMarker (天根生物有限公司)。引物 (生工生物工程上海有限公司) (见表 1)。PCR 仪 (美国应用生物系统公司 Applied Biosystems) 电泳仪 (DYY-11 型, 北京六一仪器厂)。

表 1 PCR 反应条件

Tab. 1 The conditions of PCR

项 目	16SrDNA	Pg	Pi	Fn	Aa	Tf/Td
预变性			94℃ 5 min			
变性			94℃ 30 s			
退火	30 s	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min
延伸			72℃ 2 min			
保存			4℃			
循环数	30	30	26	26	30	26

1.3 标本采集

选取每例患者 PD ≥ 4 mm 的位点, 棉卷隔湿, 干燥, 用无菌龈下刮治器插入龈沟底采集龈下菌斑, 放入置有 1 mL 硫乙醇酸盐培养基 (FT) 的 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管中, -20 °C 保存。

1.4 基因组 DNA 提取

龈下菌斑及标准菌株基因组 DNA 提取按照 TIANamp Bacteria DNA kit 操作步骤提取。

1.5 巢氏 PCR 法

1.5.1 PCR 体系 第一步为细菌通用引物 16SrDNA 扩增: 总反应体系 50 μ L, 其中 dNTP (2.5 Mm) 3 μ L, Pyrobest DNA Polymerase (5 u/uL) 0.5 μ L, 10×PCRBuffer 缓冲液 (含 MgCl₂) 5 μ L, 上游引物 (20 μ M) 0.5 μ L, 下游引物 (20 μ M) 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 无菌去离子水补足总体

积至 50 μ L。第二步为 6 种特异引物扩增: 总反应体系 25 μ L, 其中 dNTP 2 μ L, Pyrobest DNA Polymerase 及 10×PCRBuffer 上述减半, 引物同上, 模板 (第一步扩增产物 2 μ L), 无菌去离子水补足总体积至 25 μ L。

1.5.2 PCR 反应条件 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 53 °C ~ 60 °C 退火 30 s ~ 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 经 26 ~ 30 个循环后, 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存 (见表 1)。本研究使用的引物序列及退火温度参照文献^[4], 见表 2。

1.5.3 PCR 反应产物电泳 取扩增产物 5 μ L, Pg、Pi、Fn、Aa、Td 和 Tf 的标准株做阳性对照, 以不加任何模板的反应体系为空白对照, 100 bp Marker 为分子量标准。1% 琼脂糖凝胶电泳, U = 100 V, I = 50 mA, P = 50 W, 恒压电泳 40 min, 凝胶成像

仪观察扩增产物条带, 见表2.

表2 使用的引物序列及退火温度

Tab. 2 Sequence and annealing temperature of primers

微生物种类	引物对 (5'→3')	产物 (bp)	退火温度 (°C)
Pg	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	404	60
	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT		
Pi	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG	575	55
	TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T		
Tf	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA	641	60
	TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T		
Fn	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	360	63
	GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG		
Aa	ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	557	55
	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC		
Td	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T	316	60
	TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA		
16SrDNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1 505	53
	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT		

1.6 统计学处理

使用 SPSS 统计软件包, 秩和检验方法进行分析, 检验标准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

50 例 CP 及 50 例 CP 合并 CHD 患者中, 轻度 CP 各 10 例, 中度 CP 各 19 例, 重度 CP 各 21 例. CP 组细菌检出率为 Pg 98%, Pi 92%, Fn

88%, Aa 6%, Tf 92%, 和 Td 98%; CP 合并 CHD 组细菌检测出率为: Pg 100%, Pi 94%, Fn 80%, Aa 14%, Tf 96% 和 Td 98%. 按 CP 轻、中、重度分组的细菌检出例数及检出率 (见表 3).

数据经统计学秩和检验分析, CP 组与 CP 合并 CHD 组间轻 / 轻、中 / 中、重 / 重比较结果均无统计学意义 ($P > 0.05$). PCR 扩增产物电泳结果 (见图 1 ~ 7).

表3 6种牙周致病菌在不同程度牙周病变中的分布

Tab. 3 Distribution of six periodontal pathogens in periodontitis with different degree in the severity

	n	阳性检出率 [n(%)]					
		Pg	Pi	Fn	Aa	Td	Tf
CP 组龈下菌斑							
轻度	10	9(90.00)	7(70.00)	7(70.00)	0(0.00)	9(90.00)	7(70.00)
中度	19	19(100.00)	18(94.73)	17(89.47)	1(5.26)	19(100.00)	19(100.00)
重度	21	21(100.00)	21(100.00)	20(95.24)	2(9.52)	21(100.00)	20(95.24)
CP+CHD 组龈下菌斑							
轻度	10	10(100.00)	10(100.00)	7(70.00)	2(20.00)	10(100.00)	9(90.00)
中度	19	19(100.00)	18(94.73)	16(84.21)	1(5.26)	18(94.73)	19(100.00)
重度	21	21(100.00)	19(90.48)	17(80.95)	4(19.05)	21(100.00)	20(95.24)

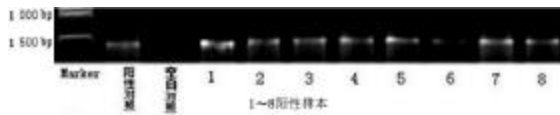


图 1 通用引物 16SrDNA PCR 产物电泳图

Fig. 1 The electrophoresis picture of PCR products of 16SrDNA



图 2 Pg PCR 产物电泳图

Fig. 2 The electrophoresis picture of PCR products of Pg



图 3 Pi PCR 产物电泳图

Fig. 3 The electrophoresis picture of PCR products of Pi

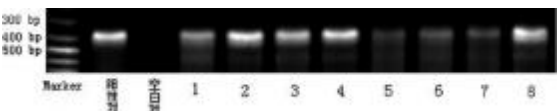


图 4 Fn PCR 产物电泳图

Fig. 4 The electrophoresis picture of PCR products of Fn

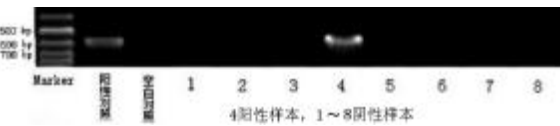


图 5 Aa PCR 产物电泳图

Fig. 5 The electrophoresis picture of PCR products of Aa



图 6 Td PCR 产物电泳图

Fig. 6 The electrophoresis picture of PCR products of Td

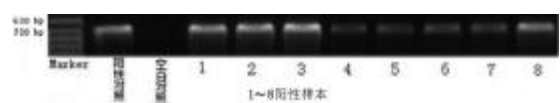


图 7 Tf PCR 产物电泳图

Fig. 7 The electrophoresis picture of PCR products of Tf

3 讨论

国内外牙周可疑致病菌的检测阳性率高高低不等. 张梅^[5]用实时 PCR 法检测 CP 合并 CHD 患者牙周袋内牙周致病菌的检测出率为: Pg 13.79%, Pi 8.38%, Aa 17.78%, Tf 7.60%和 Td 7.90%, 与单纯 CP 患者比较只有 Pg 有差别. 刘华^[6]对 44 例冠心病患者的龈下菌斑检测牙周致病菌的检出率分别为: Pg 43.18%、Aa 20.45%、Pi 61.36%、Fn 86.36%、Tf 93.18%; 本研究中 50 例 CP 及 50 例 CP 合并 CHD 患者中, CP 组细菌检出率为 Pg 98%, Pi 92%, Fn 88%, Aa 6%, Tf 92%, 和 Td 98%; CP 合并 CHD 组细菌检测出率为: Pg 100%, Pi 94%, Fn 80%, Aa 14%, Tf 96%和 Td 98%, 与以上研究相比 Aa 阳性率偏低. Aa 与侵袭性牙周炎关系密切, 其在侵袭性牙周炎牙周袋中检测阳性率高达 97%, 而 CP 者或健康部位检测率低于 20%^[3], 这与本研究 Aa 检测率相近.

本研究发现 Pg、Pi、Fn、Tf 及 Td 检出率高, 且同一例样本中这 5 种菌几乎都能检测出, 表明慢性牙周炎是多种致病菌协同致病结果. 本研究还发现 CP 合并 CHD 的患者龈下菌斑中 6 种牙周可疑致病菌检出与 CP 患者相近, 且轻 / 轻、中 / 中、重 / 重比较结果均无统计学差异, 表明 CP 合并 CHD 可能在致病微生物方面相同, 并可能具有相同的致病机制, 即致病微生物在牙周组织局部造成组织炎症和破坏同时, 因受损的袋内壁上皮屏障作用降低, 细菌及其毒性产物可能侵入组织深处或血循环, 进而触发全身性感染及炎症反应^[7]. 研究证实, G- 菌脂多糖 (LPS) 可诱导一系列的血管反应包括: 血管壁炎性细胞的浸润, 血管平滑肌增殖, 血管脂肪性变及管内脂肪聚集^[8]. LPS 可上调内皮细胞粘附分子的表达及白细胞介素 1 (IL-1), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和血栓素的分泌, 导致血小板聚集和粘附, 泡沫细胞的形成, 胆固醇和胆固醇酯的沉积. 以上研究都证实牙周组织炎症与动脉粥样硬化在发病机制上有相互关联, 但牙周炎症影响动脉粥样硬化的机制, 特别是微生物在其中的作用及机制目前尚不清楚, 有待进一步的研究.

[参考文献]

[1] WILLIAM G, HAYNES, CLARK STANFORD. Periodon- (下转第 102 页)