论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0206-04

模拟高原缺氧环境对家兔慢性牙周炎龈下菌群种类分布的影响

罗 丽[1],张 纲[1],祝金香[1],谭颖徽[1],高钰琪[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔科[1];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系[2])

[摘要] **目的** 模拟高原缺氧环境,构建兔牙周炎动物模型,研究其龈下菌斑中的主要牙周致病菌与平原组的差异。**方法** 选取清洁级家兔40只完全随机设计分成4组:平原实验组、平原对照组、高原实验组、高原对照组各10只,实验组采用正畸结扎丝结扎双下颌前牙,并给予高糖饮食;高原组置模拟海拔5 000 m的低压氧舱,每天缺氧23 h,持续饲养8周。8周后提取龈下菌斑基因组DNA,用PCR扩增细菌16S rDNA片段方法检测标本中6种牙周炎致病菌包括牙龈卟啉单胞菌(*Dorhyromonas gingivalis*,*Pg*)、福赛斯坦纳菌(*Bacterides forsythus*,*Bf*)、伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aa*)、中间普氏菌(*Prevotella intermedia*, *Pi*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *Fn*)和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*, *Td*)的检出率。**结果** 与平原实验组相比,高原实验组的牙龈出血指数、菌斑指数和牙周袋深度均有统计学差异($P<0.05$)。牙周可疑致病菌*Pg*、*Bf*、*Aa*、*Pi*、*Fn*和*Td*在高原实验组和平原实验组都可检出,其中高原实验组*Fn*的检出率80%高于平原实验组20%($P<0.05$);平原实验组*Pi*的检出率70%高于高原实验组15%($P<0.05$)。**结论** 高原低氧环境是牙周炎加重的主要原因,*Fn*与高原牙周炎病变程度加重有一定关系。

[关键词] 牙周炎;高原低氧;动物模型;致病菌
[中图法分类号] R780.2; R781.42; R339.54 [文献标志码] A

Distribution of subgingival microbial category in periodontitis rabbits under simulated high altitude hypoxia condition

Luo Li[1], Zhang Gang[1], Zhu Jinxiang[1], Tan Yinghui[1], Gao Yuqi[2] ([1]Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the difference of main pathogenic bacteria in subgingival plaque of periodontitis rabbits under normal oxygen and simulated high altitude hypoxia conditions. **Methods** A total of 40 rabbits were randomly divided into 4 groups including a normal oxygen periodontitis group, a normal control group, a hypoxia periodontitis group and a hypoxia control group ($n=10$). Rabbits of the periodontitis groups were given ligation of anterior teeth by steel wire and high-carbohydrate diet, while rabbits of the hypoxia groups were raised in a low pressure oxygen cabin simulating high altitude hypoxia condition (5 000 m), 23 h/day for 8 weeks. Genomic DNA in subgingival plaque was extracted after 8 weeks treatment and 16S rDNA gene fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) to test 6 periodontits pathogenic bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Bacteroides forsythus* (*Bf*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) *and Treponema denticola* (*Td*). **Results** Gingival bleeding index, plaque index and periodontal pocket depth in the hypoxia periodontitis group were significantly different from those in the normal oxygen periodontitis group ($P<0.05$). Putative periodontal pathogens, including *Pg*, *Bf*, *Aa*, *Pi*, *Fn* and *Td*, were detected both in the hypoxia periodontitis group and normal oxygen periodontitis group. The positive rate of *Fn* in the hypoxia periodontitis group (80%) was higher that in the normal oxygen periodontitis group (20%) ($P<0.05$), while the positive rate of *Pi* was higher in the normal oxygen periodontitis group (70%) than that in the hypoxia periodontitis group (15%) ($P<0.05$). **Conclusion** High altitude hypoxia is the main reason of periodontitis aggravation, which is also

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA184)
[通信作者] 谭颖徽,电话:(023)68755632
高钰琪,电话:(023)68752331

associated with *Fn*.

[**Key words**] periodontitis; high altitude hypoxia; animal model; pathogenic bacteria

Supported by the Foundation of Medical Sciences and Public Health of PLA (06MA184). Corresponding author: Tan Yinghui, Tel: 86-23-68755632; Gao Yuqi, Tel: 86-23-68752331

慢性牙周炎(chronic periodontitis)是由牙菌斑中的微生物所引起的牙周支持组织的慢性感染性疾病,是成年人丧失牙齿的主要原因。在高原环境下,牙周炎的患病率显著高于其他地区,高达 70.2%[1]。牙周微生物是牙周炎发生的始动因子,目前证实的与牙周炎发生有关的可疑致病菌有十余种,不同病因不同类型的牙周炎其主要牙周可疑致病菌种类也不尽相同。本研究模拟高原缺氧环境建立牙周炎动物模型,收集龈下菌斑,从龈下菌斑中提取基因组 DNA,用 PCR 扩增细菌 16S rDNA 片段方法检测动物模型中 6 种常见的牙周炎致病菌:*Pg*、*Bf*、*Aa*、*Pi*、*Fn*、*Td*,分析高原低氧环境下慢性牙周炎龈下菌群的特点,从微生物角度探讨高原低氧环境与牙周炎发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

清洁级家兔,雌雄各半,体质量(2 000 ± 50) g,新桥医院实验动物中心;标准菌株 *Pg*(ATCC 33277)、*Aa*(ATCC 43718)、*Td*(ATCC 43037)、*Fn*(ATCC 25586)、*Pi*(ATCC 25611)、*Bf*(ATCC 43037)(卫生部口腔生物医学工程重点实验室);低压氧舱(第三军医大学高原医学系);GelDOC2000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);PYC-150 型 PCR 仪(MJ Research 公司,美国);水平电泳仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型建立 取健康家兔 40 只(新桥医院实验动物中心,雌雄各半,平均体质量 2 000 g)完全随机设计分为平原对照组、平原实验组、高原对照组、高原实验组,共 4 组,每组 10 只家兔,每组结扎 20 颗牙。

1.2.2 牙周炎模型的建立 将平原、高原实验组家兔用 30 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)肌肉注射麻醉,固定四肢和头部,用口腔正畸结扎钢丝(直径 0.2 mm)结扎双下颌前牙牙颈部,结扎丝放入游离龈沟内,深度以不损伤牙龈的结合上皮,又可避免结扎后滑脱为原则。高糖饲料 Keyes 2000(果糖 56%、脱脂奶粉 28%、面粉 6%、酵母 4%、苜蓿粉 3%、动物肝粉 1%、食盐 2% 及少量蔬菜)喂养。将高原实验组和高原对照组置于低压舱模拟海拔高度为 5 000 m 的环境,每天缺氧时间为 23 h。平原实验组和平原对照组在正常环境下饲养。

1.2.3 牙周各项指标检测 术后第 8 周,分别检查各组动物实验下颌中切牙龈指数(gingival index, GI):用牙周探针放在双下颌中切牙牙龈边缘龈沟开口处,并沿龈缘轻轻滑动,移出探针后观察牙龈出血情况;牙菌斑指数(plaque index, PLI):用棉签蘸取少量菌斑显示液,均匀涂布于双下颌中切牙牙面、龈缘及邻间隙处,待 1 ~ 2 min 后观察显色情况,采用 Loe 和 Slliness 四分度记分标准;探诊深度(probing depth, PD):牙周探针沿着双下颌中切牙长轴的颊、舌面远中、中、近中测量,共 6 个位点取均值。操作均由 1 人完成。

1.3 采集龈下菌斑

取样位点隔湿后,去除龈上菌斑,用无菌刮匙器从牙周袋最底部刮取龈下菌斑,置予无菌 EP 管中,-70℃备检。

1.4 龈下菌斑和标准菌株总 DNA 提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取龈下菌斑和标准菌株基因组 DNA。

1.5 PCR 反应体系及条件

PCR 所用特异性引物序列见表 1[2]。①PCR 反应体系。DNA 模板 1 μl,2 × *Taq* PCR MasterMix 12.5 μl,上、下游引物(25 μmol/L)各 1 μl,去离子水 9.5 μl,总体积 25 μl。②PCR 反应条件。95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 45 s,57 ~ 60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,经 32 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。③PCR 反应产物电泳。取 PCR 扩增产物 5 μl,6 种国际参考标准菌株即 *Pg*(ATCC 33277)、*Aa*(ATCC 43718)、*Td*(ATCC 43037)、*Fn*(ATCC 25586)、*Pi*(ATCC 25611)、*Bf*(ATCC 43037)为阳性对照,变型链球菌(ATCC 27607)为阴性对照,不加任何模板的反应体系为空白对照。100 V 电压下 2% 琼脂糖凝胶电泳 50 min,以 DNA Marker DL 1 000 为 DNA 分子量标准,紫外线检测仪下观察扩增带。

表 1 *Pg*、*Bf*、*Aa*、*Pi*、*Fn*、*Td* 特异性引物序列

基因	序列(5′→3′)	预期产物长度(bp)
Pg	上游:AGGCAGCTTGCCATACTGCG 下游:ACTGTTAGCAACTACCGATGT	412
Aa	上游:ATGCCAAATTGACGTTAAAT 下游:AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC	557
Td	上游:TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT 下游:TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA	316
Fn	上游:GGCCACAAGGGGACTGAGACA 下游:TTTAGCCGTCACTTCTTCTGTTGG	161
Pi	上游:CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA 下游:CCGCTTTACTCCCCAACAAA	267
Bf	上游:GCGTATGTAACCTGCCCGCA 下游:TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	641

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,等级资料 GI、PLI 采用秩和检验,计量资料 PD 以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 建模后牙周组织学特征

高原实验组牙龈呈现暗红色,冠周出现组织坏死,牙龈触之出血或有自发性出血现象。X 线片观察:结扎牙齿的牙槽嵴高度明显降低(图 1)。组织病理学改变:高原实验组中,牙槽

骨出现活跃的破骨细胞性骨吸收陷窝,牙槽嵴顶及固有牙槽骨吸收、破坏(图2A)。平原实验组中,牙槽骨出现破骨细胞性骨吸收陷窝,牙槽嵴顶吸收、破坏(图2B)。以上显示成功建立了牙周炎动物模型。

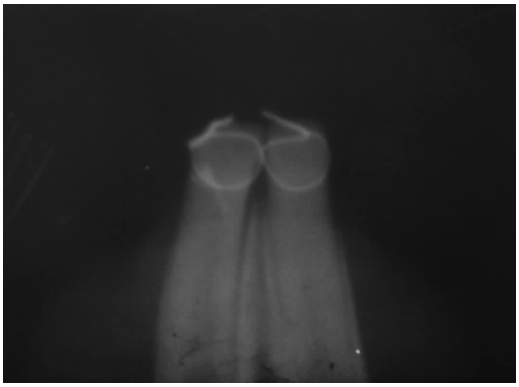


图1 建模后8周家兔实验牙槽骨X线片表现

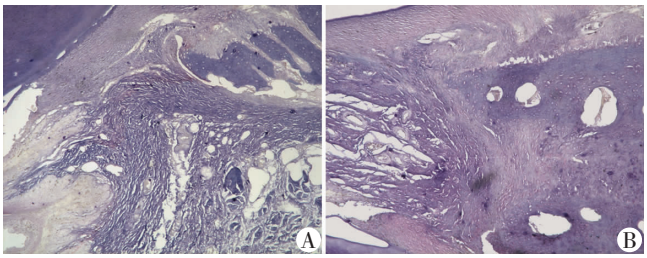


图2 高原实验组(A)和平原实验组(B)牙周组织形态学观察 (HE×100)

2.2 各组家兔牙周临床指标比较

临床指标结果显示,高原实验组牙周指标GI、PLI均高于其余各组,与高原对照组和平原实验组相比有显著差异($P<0.05$)。高原实验组PD值(4.433±0.171)显著高于高原对照组(3.370±0.104)和平原实验组(4.070±0.126),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 各组家兔6种可疑致病菌检出率比较

Pg、*Fn*、*Bf*、*Aa*、*Td*可疑致病菌在高原实验组的检出率高于高原对照组及平原组,其中*Fn*在高原实验组的检出率为80%,显著高于其余各组($P<0.05$);*Pi*在平原实验组的检出率为70%,显著高于其余各组($P<0.05$)。见表2。

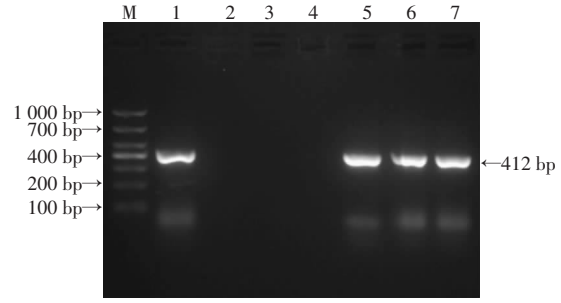
表2 6种主要牙周可疑致病菌的检出率[例(%)]

组别	*n*	*Pg*	*Fn*	*Bf*	*Pi*	*Aa*	*Td*
平原对照组	20	6(30)	2(10)[a]	6(30)	1(5)[b]	2(10)	1(5)
高原对照组	20	13(65)	5(25)[a]	14(70)	4(20)[b]	4(20)	2(10)
平原实验组	20	18(90)	4(20)[a]	16(80)	14(70)	3(15)	6(30)
高原实验组	20	20(100)	16(80)	18(90)	3(15)[b]	6(30)	8(40)

a: $P<0.05$,与高原实验组比较; b: $P<0.05$,与平原实验组比较

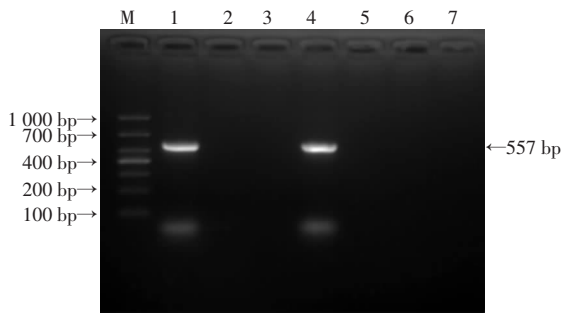
2.4 PCR检测菌斑结果

4组家兔龈下菌斑致病菌PCR扩增结果见图3~6。在412 bp处可检测到*Pg*目的片段,在557 bp处可检测到*Aa*目的片段,在161 bp处可检测到*Fn*目的片段,在267 bp处可检测到*Pi*目的片段。



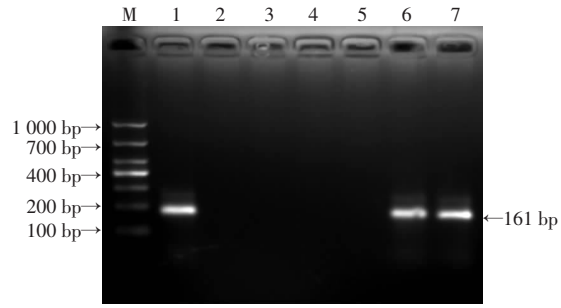
M:标准;1:*Pg* 33277阳性对照;2:变形链球菌阴性对照;3:空白对照;4:平原对照组;5:平原实验组;6:高原对照组;7:高原实验组

图3 *Pg* PCR扩增产物电泳结果



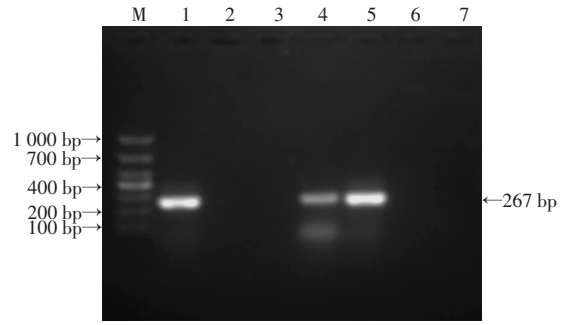
M:标准;1:*Aa* 43718阳性对照;2:变形链球菌阴性对照;3:空白对照;4:平原对照组;5:平原实验组;6:高原对照组;7:高原实验组

图4 *Aa* PCR扩增产物电泳结果



M:标准;1:*Fn* 25586阳性对照;2:变形链球菌阴性对照;3:空白对照;4:平原对照组;5:平原实验组;6:高原对照组;7:高原实验组

图5 *Fn* PCR扩增产物电泳结果



M:标准;1:*Pi* 25611阳性对照;2:变形链球菌阴性对照;3:空白对照;4:平原对照组;5:平原实验组;6:高原对照组;7:高原实验组

图6 *Pi* PCR扩增产物电泳结果

3 讨论

牙周炎是一种常见的、多发的感染性破坏性口腔

疾病,直接危害口腔健康,也是引起口腔失牙的主要原因[3]。建立稳定、可靠的实验性牙周炎的动物模型,可以为牙周炎病因学研究提供科学可信的实验依据。本研究依据孔燕等[4]采用正畸丝牙颈部结扎加高糖饮食在低压氧舱内模拟高原环境(海拔 5 000 m)下建立了家兔牙周炎的动物模型。通过检测证实高原实验组和平原实验组的动物模型在牙周炎的临床表现、病理和致病菌等方面均存在差异性,为高原牙周炎的研究提供一个良好的动物模型。周霞等[5]最近研究结果表明在高原环境下,高原牙周炎大鼠龈沟液中的 C-反应蛋白水平高于平原牙周炎组,提示高原环境下牙周炎的病变程度更严重。

在牙周炎的细菌检测中,已有多种方法可供选择,如细菌培养、PCR、DNA 探针、限制性内切酶等检测方法,均各有优缺点。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。近年来有大量学者用此法检测牙周可疑致病菌,都取得了可信任的结果[6-7]。还有学者通过检测唾液中的牙周致病菌来研究其发病机制[8]。本实验在 PCR 反应过程中设置了阳性对照、阴性对照及空白对照,保证了引物的高度特异性。检测结果显示高原实验组 *Pg*、*Bf*、*Fn*、*Aa*、*Pi*、*Td* 检出率分别是 100%、90%、80%、30%、15%、40%,其中检出率最高的是 *Pg*、*Bf*。平原实验组检出率最高的细菌同样的是 *Pg*、*Bf*。它们具有显著的毒力或致病性,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[9-11]。研究发现 *Bf* 和 *Pg* 常常联合检出,*Bf* 和 *Pg* 共同培养时,发现 *Bf* 的毒力和侵袭性增强;可能是因为 *Pg* 的多种酶将组织分解,造成细胞外基质表面暴露,*Bf* 借助自身的 *BspA* 蛋白黏附其上,促进疾病的发生、发展[12-14]。

在对高原实验组和平原实验组龈下菌斑致病菌的阳性率比较时发现:高原实验组 *Fn* 的检出率 80% 明显高于平原实验组 20%;平原实验组 *Pi* 的检出率 70% 明显高于高原实验组 15%。牙周可疑致病菌 *Pi* 虽然是平原牙周炎的优势菌,但并不是高原牙周炎的优势菌,可能的原因是:在高原低氧环境下,机体红细胞(RBC),淋巴细胞(HB)均增多,血液黏滞度增高,微循环中血流缓慢甚至停滞[15],因而可以造成牙周组织不能进行有效气体和物质交换及正常细胞代谢。高原病理生理的特点可能造成牙周组织无氧代谢增加,pH 值下降,不利于某些细菌如 *Pi* 的生长和繁殖,而 *Fn* 可以在 pH 5.0 ~ 7.0 的较宽范围内生存。Takahashi[16]研究表明,使用谷氨酸和天冬氨酸两种唾液中的主要氨基酸作为饲养底物,*Fn* 可以产生有机酸和氨,使菌斑环境接近中性,改变局部 pH 值利于其生长和繁殖。但确切的机制有待进一步阐明。

本研究表明高原低氧环境可能是加重牙周疾病的一个主要原因,龈沟液中细胞因子的水平、pH 值和 O_2 分压与平原相比均有较大改变,更利于 *Pg*、*Fn*、*Bf* 等一些细菌的定殖,大量繁殖后成为优势菌。而 *Pi*、*Aa*、*Td* 等某些牙周致病菌在局部微环境的改变或者在菌群间的竞争中失去了优势,数量逐渐减少,最终引起龈下细菌的种类和数量发生改变。高原环境影响和改变了牙周疾病发生、发展和转归的规律。

参考文献:

[1] 张远华, 曹桢吾. 4500 米高原 1000 名官兵牙周炎调查分析[J]. 解放军预防医学杂志, 1995, 13(2): 150 - 151.
[2] 王者玲, 岗本公彰, 杨圣辉, 等. PCR 直接检测龈下菌斑主要可疑牙周致病菌[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(2): 115 - 116.
[3] 曹采方. 牙周病学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
[4] 孔燕, 谭颖徽, 张纲, 等. 模拟高原条件下大鼠牙周炎模型牙周组织中 TNF-α、PGE2 的表达[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(5): 261 - 264.
[5] 周霞, 刘鲁川, 孔耀, 等. 模拟高原条件下牙周炎动物模型龈沟液中 C-反应蛋白的变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 107 - 110.
[6] Masunaga H, Tsutae W, Oh H, *et al*. Use of quantitative PCR to evaluate methods of bacteria sampling in periodontal patients[J]. J Oral Sci, 2010, 52(4): 615 - 621.
[7] Morikawa M, Chiba T, Tomii N, *et al*. Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction [J]. J Periodontal Res, 2008, 43(3): 268 - 274.
[8] Rotimi V O, Salako N O, Divia M, *et al*. Prevalence of periodontal bacteria in saliva of Kuwaiti children at different age groups[J]. J Infect Public Health, 2010, 3(2): 76 - 82.
[9] Nunn M E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors[J]. Periodontol 2000, 2003, 32: 11 - 23.
[10] Ezzo P J, Cutler C W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease[J]. Periodontol 2000, 2003, 32: 24 - 25.
[11] 刘正. 口腔生物学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
[12] Sharma A, Sojar H T, Glurich I, *et al*. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from Bacteroides forsythus ATCC 43037[J]. Infect Immun, 1998, 66 (12): 5703 - 5710.
[13] Yoneda M, Yoshikane T, Motooka N, *et al*. Stimulation of growth of Porphyromonas gingivalis by cell extracts from Tannerella forsythia [J]. J Periodontal Res, 2005, 40(2): 105 - 109.
[14] Faghri J, Moghim S H, Abed A M, *et al*. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and Bacteroides forsythus in chronic periodontitis by multiplex PCR[J]. Pak J Biol Sci, 2007, 10(22): 4123 - 4127.
[15] 李继红. 氧自由基、唾液酸及血液粘度、红细胞聚集、变形指数在低氧环境非习服时变化的意义[J]. 四川医学, 2009, 30(10): 1643 - 1645.
[16] Takahashi N. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Fusobacterium nucleatum[J]. Oral Microbiol Immunol, 2003, 18(2): 109 - 113.

(**收稿**:2011-09-12;**修回**:2011-10-17)
(编辑 张 维)