论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0492-03

高原地区牙周炎患者唾液中3种牙周致病菌与临床牙周指数的相关性研究

刘 莉,谭颖徽,吕 俊,张 纲 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔科)

[摘要] **目的** 分析高原地区牙周炎患者唾液中3种牙周致病菌与牙周临床指标的关系。**方法** 对高原地区慢性牙周炎(chronic periodontitis,CP)患者和牙周健康(periodontal health,PH)人群共100名受检者进行牙周检查,记录探诊出血情况(bleeding on probing,BOP)、探诊深度(probing depth,PD)和临床附着丧失(attachment loss,AL)。收集各受检者的非刺激全唾液,使用PCR方法检测牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*,*Pg*)、福赛坦菌(*Tannerella forsythia*,*Tf*)和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*,*Td*)的阳性检出率。**结果** CP组*Pg*、*Tf*、*Td*检出率均明显高于PH组($P<0.05$);BOP阳性组3种细菌检出率均明显高于BOP阴性组($P<0.05$);随着PD和AL的增加,*Pg*、*Tf*、*Td*检出率也增高。**结论** 高原慢性牙周炎患者唾液中*Pg*、*Tf*和*Td*的检出率与牙周临床指标呈正相关。

[关键词] 高原;牙周炎;唾液;牙周致病菌;牙周临床指标
[中图法分类号] R339.54; R378; R781.42 [文献标志码] A

Correlation of prevalence of 3 periodontal pathogens in saliva with clinical peridontal parameters in chronic periodontitis patients in high altitude

Liu Li, Tan Yinghui, Lyu Jun, Zhang Gang (Department of Stomatology, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the positive rate of 3 periodontal pathogens in chronic periodontitis (CP) patients living in plateau, and analyze the correlation between the prevalence and clinical periodontal parameters. **Methods** A total of 50 CP patients and 50 periodontal healthy subjects (PH) living in plateau (about 3 800 m) were recruited in this study. Clinical periodontal parameters including bleeding on probing (BOP), probing depth (PD), and attachment loss (AL) were recorded. Moreover, 3 periodontal pathogens in the saliva, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tannerella forsythia* (*Tf*) and *Treponema denticola* (*Td*) were detected by 16S rRNA based polymerase chain reaction (PCR). **Results** The prevalence of *Pg*, *Tf*, and *Td* were much higher in CP group than that in HP group ($P<0.05$). Moreover, the prevalence of *Pg*, *Tf*, and *Td* were much significantly higher in BOP(+) group than those in BOP(−) group ($P<0.05$). And there were significant statistical differences between aforementioned groups. With the increase of PD and AL, the the prevalence of *Pg*, *Tf*, and *Td* became higher. **Conclusion** The prevalence of periodontal pathogens *Pg*, *Tf* and *Td* are positively correlated with clinical periodontal parameters in chronic periodontitic patients in plateau.

[**Key words**] high altitude; periodontitis; saliva; periodontal pathogens; clinical periodontal parameter

Supported by the General Project of "Eleventh Five-year Plan" of Medical Sciences of PLA (06MA184) and the General Project of "Twelfth Five-year Plan" of Logistic Sciences of PLA(CWS12J096). Corresponding author: Zhang Gang, Tel: 86-23-68774645, E-mail:xqyykqk@163.com

慢性牙周炎是发生在牙齿支持组织的慢性感染性疾病,主要临床表现为牙龈炎症、牙周袋形成、牙槽骨吸收和牙齿松动等。前期研究表明高原特殊环境下,缺氧等因素对牙周致病菌的影响可能在牙周炎的形成和快速进展中起重要作用。而局部致病因素中,牙周致病菌的侵袭是牙周炎发病的基础,目前公认的牙周致病菌主要有牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*,*Pg*)、福赛坦菌(*Tannerella forsythia*,*Tf*)和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*,*Td*)等[1]。本研究采用PCR方法对高原牙周炎患者唾液中*Pg*、*Tf*和*Td*进行DNA分析,探讨高原地区慢性牙周炎患者唾液中牙周致病菌与牙周临床指标的关系。

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA184);全军后勤科研"十二五"计划面上项目(CWS12J096)
[通信作者] 张 纲,电话:(023)68774645, E-mail:xqyykqk@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1111.006.html(2013-12-20)

1 资料与方法

1.1 研究对象

2012年8月在西藏林周县人民医院口腔科门诊(海拔3 800 m左右)对包括就诊患者和工作人员在内的受检者进行

牙周健康检查,选取在当地居住时间超过 1 年的慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)患者 50 例、牙周健康(periodontal health, PH)者 50 例。CP 的诊断遵循 1999 年牙周病分类国际研讨会所制定的标准[2]。CP 组纳入标准:①年龄 25 ~ 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 组纳入标准:①年龄 20 ~ 50 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%。统一排除标准:①全身有糖尿病和甲亢等系统性疾病;②妇女为妊娠期或服用避孕药;③近半年曾做过牙周基础治疗;④2 周内服用过抗生素;⑤急慢性涎腺炎或涎腺结石患者;⑥伴有其他口腔黏膜病者,如复发性口腔溃疡、口腔扁平苔藓等;⑦吸烟;⑧近半年使用过交感神经抑制药,如阿托品、阿米替林、皮质激素止痛药等;⑨干燥综合征患者或者因为头颈部放疗而引发唾液分泌功能障碍者。受检者均签署知情同意书。

1.2　实验材料与仪器

标准菌株(口腔疾病研究国家重点实验室),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 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),自动凝胶成像分析仪(美国安莱公司)。

1.3　方法

1.3.1　牙周检查方法　　自然光线下(少数光线不足,以人工光源辅助),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[3]。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。患者指数牙缺失,或者有牙石覆盖牙面、残根,有不良修复体覆盖而无法进行牙周检查,则不纳入研究。参照《第三次全国口腔健康流行病学调查标准》记录探诊出血情况(bleeding on probing, BOP)、探诊深度(probing depth, PD)和临床附着丧失(attachment loss, AL)等牙周临床指标。根据牙周临床指标将受检者分为 CP 组(PD > 4 mm, AL > 1 mm, BOP 阳性)、PH 组(PD < 4 mm,无附着丧失, BOP 阴性)。CP 患者均拍摄全口根尖片,证实有邻面牙槽骨吸收。

1.3.2　唾液样本收集与处理　　受检者静坐、低头留取 5 min 非刺激全唾液,采用吸取法收集唾液 0.5 mL 放入 EP 管中,高速冷冻离心后取沉淀用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取(按说明书操作)。

1.3.3　引物合成与 PCR 检测　　3 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。使用 PCR 扩增仪对唾液细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外线检测仪下观察扩增带(按说明书操作)。

表 1　*Pg*、*Tf*、*Td* 特异性引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
Pg	上游: 5′-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3′	412
	下游: 5′-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3′	
Td	上游: 5′-TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT-3′	316
	下游: 5′-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3′	
Tf	上游: 5′-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3′	641
	下游: 5′TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3′	

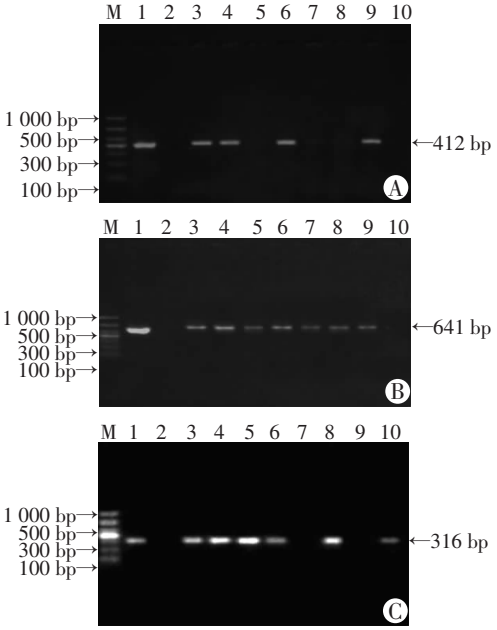
1.4　统计学分析

用 SPSS 13.3 统计软件进行数据处理,采用 χ^2 检验比较不同牙周状况的 *Pg*、*Tf*、*Td* 检出率,用双向有序关联检验分析各临床指标与 *Pg*、*Tf*、*Td* 的关系。

2　结果

2.1　唾液样本中牙周致病菌 PCR 扩增产物电泳结果

在 412、641、316 bp 处可分别检测到 *Pg*、*Tf*、*Td* 目的片段。见图 1。



A: *Pg*; B: *Tf*; C: *Td*

M: DNA 标准(DL 1000); 1: 标准菌阳性对照; 2: 阴性对照; 3 ~ 6: CP 组; 7 ~ 10: PH 组

图 1　唾液中 *Pg*、*Tf*、*Td* 的 PCR 扩增产物电泳结果

2.2　3 种牙周致病菌检测情况

Pg、*Tf*、*Td* 在各组的检出率见表 2。CP 组 *Pg*、*Tf*、*Td* 检出率均明显高于 PH 组($P < 0.05$);BOP(+)组 *Pg*、*Tf*、*Td* 的检出率均明显高于 BOP(−)组($P < 0.05$);经双向有序关联检验分析,随着 PD 和 AL 的增加,*Pg*、*Tf*、*Td* 检出率均升高。

表 2　3 种牙周致病菌在各组唾液样本中的检出率[例(%)]

组别	*Pg*	*Tf*	*Td*
CP 组	50(100)[a]	48(96)[a]	50(100)[a]
PH 组	13(26)	10(20)	9(18)
BOP(+)组	45(90)[b]	43(86)[b]	41(82)[b]
BOP(−)组	7(14)	5(10)	5(8)
PD > 6 mm 组	30(100)	30(100)	27(90)
PD 4 ~ 6 mm 组	15(75)	12(60)	12(60)
PD < 4 mm 组	6(12)	9(18)	11(22)
AL > 3 mm 组	30(100)	30(100)	27(90)
AL 1 ~ 3 mm 组	15(75)	12(60)	12(60)
AL < 1 mm 组	13(26)	10(20)	9(18)

a: $P < 0.05$,与 PH 组比较; b: $P < 0.05$,与 BOP(−)组比较

3　讨论

高原特殊环境可导致全身系统性改变,包括红细胞增多、红细胞压积增加、血液黏滞度增加等,从而造成牙周组织局部微环境变化,可能加重牙周炎患者牙

周组织的炎症反应[4]。高原环境下机体各器官都有不同程度的缺氧,局部牙周组织缺氧可能使厌氧菌生长繁殖加快。而且高原环境气候寒冷干燥,口腔内不能保持正常的温度和湿度,唾液分泌也减少,加上一些营养物质的缺乏,可能削弱牙周组织的修复能力。有研究表明,我国高原地区牙周炎患病率多达70.4%[5],显著高于其他地区。最新调查表明,随海拔高度的增加和居住时间的延长,牙周炎患病率呈上升趋势[6]。

唾液是一种维持口腔健康的重要生理性体液,含丰富的营养成分,是细菌很好的培养基,龈袋或牙周袋内的微生物会不断地通过龈沟液流向唾液,另外口腔中的微生物也可随唾液的流动再定植到牙周袋或龈袋内。Giannobile 等[7]认为对唾液的分析可以作为诊断牙周病的方法之一,文献[8-9]报道唾液可能成为判断口腔及机体健康发生变化时的特异生物标志分子的来源。国内学者冯向辉等[10]也发现,*Pg*、*Tf*、*Td* 在同一患者唾液样本和龈下菌斑样本检测结果的一致性均较高,提示唾液样本可以用于口腔内牙周致病菌的检测。在牙周炎的细菌检测中,有细菌培养、PCR、DNA探针、限制性内切酶等检测方法。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。所以本研究采用 PCR 方法检测高原地区 CP 患者唾液中的 *Pg*、*Tf*、*Td*,探讨高原地区 CP 患者牙周致病菌与牙周临床指标的相关性。

牙周炎是菌斑引起的感染性疾病,人类口腔中有数百种细菌,与牙周病有关的有十余种。目前认为与牙周病关系密切的细菌主要有 *Pg*、*Tf*、*Td* 和伴放线菌嗜血菌等,其中 *Pg*、*Tf*、*Td* 被认为与 CP 密切相关。Socransky 等[1]根据龈下微生物的聚集特性以及与牙周状况的关系将龈下微生物分为不同的复合体,分别以红、橙、黄、绿、紫、蓝表示,其中红色复合体包括 *Pg*、*Tf*、*Td* 与牙周袋深度、探诊出血密切相关。有研究显示,红色复合体微生物无论是在慢性牙周炎还是在侵袭性牙周炎患者的龈下菌斑中均有较高的检出率[11]。此次研究结果中,高原环境下,*Pg*、*Tf*、*Td* 在 CP 组的检出率分别为 100%、96%、100%,明显高于 PH 组;*Pg*、*Tf*、*Td* 在 BOP(+)组的检出率分别为 90%、86%、82%,明显高于 BOP(-)组。这与以前研究结果一致。有研究表明,*Pg*、*Tf*、*Td* 的检出率与牙周袋深度呈正相关,随牙周袋深度的增加,细菌检出也增加[12-13]。*Pg* 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。*Pg*、*Tf* 常常联合检出,共同培养时,发现 *Tf* 的毒力和侵袭性增强。Lee 等[14]用 PCR 方法对 17 例局限性侵袭性牙周炎和 22 例广泛性侵袭性牙周炎患者的龈下菌斑进行检测,发现 Tf 阳性检出率高达 94.5%,而且在病变位点的检出率明显高于健康位点。近几年的研究还认为 *Td* 是牙周炎最重要的微生物危险因素之一,与牙周附着丧失明显相关[15]。本研究结果显示随着探诊深度的加深以及附着丧失的加重,受检者唾液中 *Pg*、*Tf*、*Td* 检出率均明显增高。进一步提示高原特殊环境下,*Pg*、*Tf*、*Td* 与 CP 患者的牙周组织破坏关系密切,这与以往平原地区的研究结果一致。

综上所述,本研究结果显示高原地区慢性牙周炎患者唾液中 *Pg*、*Tf*、*Td* 的检出率与牙周临床指标呈正相关,提示 *Pg*、*Tf*、*Td* 与高原牙周炎的发生、发展密切相关。这对研究高原牙周炎的发病机制有很好的参考价值。今后的工作中,为进一步探讨 *Pg*、*Tf*、*Td* 在高原牙周炎中的作用,应对其内毒素特点和基因分型进行研究。

参考文献:

[1] Socransky S S, Haffajee A D, Cugini M A, *et al*. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(2): 134-144.

[2] 曹采方. 牙周病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003: 92-108.

[3] World Health Organization. Oral health surveys Basic Methods[J]. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1997: 1-21.

[4] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2005: 35-89.

[5] 蒲东全, 刘鲁川, 宋远雄, 等. 不同海拔高度部队驻军官兵牙周健康调查[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(1): 35-38.

[6] 肖娴, 张纲, 李焰, 等. 驻高原和平原官兵口腔健康状况调查[J]. 解放军预防医学杂志, 2010, 28(1): 40-41.

[7] Giannobile W V. Salivary diagnostics for periodontal diseases[J]. J Am Dent Assoc, 2012, 143(10 Suppl): 6S-11S.

[8] Brinkmann O, Zhang L, Giannobile W V, *et al*. Salivary biomarkers for periodontal disease diagnostics[J]. Expert Opin Med Diagn, 2011, 5(1): 25-35.

[9] 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.

[10] 冯向辉, 张立, 孟焕新, 等. 牙周炎患者唾液和龈下菌斑3种厌氧微生物的检测[J]. 北京大学学报: 医学版, 2009, 41(1): 44-48.

[11] Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, *et al*. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population[J]. J Periodontol, 2003, 74(10): 1460-1469.

[12] da-Silva-Boghossian C M, do-Souto R M, Luiz R R, *et al*. Association of red complex, A. actinomycetemcomitans and non-oral bacteria with periodontal diseases[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(9): 899-906.

[13] Orth R K, O'Brien-Simpson N M, Dashper S G, *et al*. Synergistic virulence of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in a murine periodontitis model[J]. Mol Oral Microbiol, 2011, 26(4): 229-240.

[14] Lee J W, Choi B K, Yoo Y J, *et al*. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis[J]. J Periodontol, 2003, 74(9): 1329-1335.

[15] Shin J, Kho S A, Choi Y S, *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.

(**收稿**:2013-09-22;**修回**:2013-12-04)

(编辑 张 维)