

心脏移植患者龈上菌斑中五种牙周可疑致病菌的检测

曹莹 吕亚林 贾一新 韩笑 刘冬宇 丁芳

【摘要】 目的: 比较成人心脏移植患者和牙周健康者龈上菌斑中 5 种牙周可疑致病菌(具核梭杆菌(Fn)、中间普氏菌(Pi)、变黑普氏菌(Pn)、伴放线放线杆菌(Aa)及直肠弯曲菌(Cr))的分布,为进一步探讨牙周可疑致病菌对心脏移植患者牙周健康的影响提供理论依据。方法: 32 例 HT 患者和 35 例牙周健康对照者,选取 16、26 为受检牙位,进行牙周检查并采集龈上菌斑样本,应用以 16S rRNA 为基础的聚合酶链反应(PCR)技术,检测龈上菌斑中 5 种牙周病原微生物。结果: 两组 Fn、Cr、Pi 检出率均高于 Pn 和 Aa 检出率,差异有统计学意义($P < 0.01$)。5 种牙周可疑致病菌在两组间的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 心脏移植患者龈上菌斑中牙周可疑致病菌 Fn、Cr、Pi 的检出率较高,这些细菌的共同定植可能增加了心脏移植患者感染牙周病的风险。

【关键词】 心脏移植; 龈上菌斑; 牙周致病菌; 聚合酶链式反应

【中图分类号】 R54 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1007-5062(2017)02-106-05

Detection of putative periodontal pathogens in subgingival plaque in heart transplant patients CAO Ying, LV Yalin, JIA YiXin, HAN Xiao, LIU Dongyu, DING Fang. Department of Stomatology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China

【Abstract】 **Objective:** The purpose of the present study was to examine five periodontal pathogens in supragingival plaque of adult heart transplant recipients and periodontal healthy subjects. **Methods:** Supragingival plaque were collected from 32 patients with heart transplantation and 35 periodontal healthy subjects. The samples were collected from the labial surfaces of both maxillary first molar. Extracted DNA from plaque samples was used for 16s RNA PCR analysis. Clinical assessments including debris index (DI), calculus index, (CI), probing depth (PD), bleeding index (BI), and gingival overgrowth (GO) were performed at sampling sites and recorded. **Results:** There was a significantly higher percentage expression of F. nucleatum, C. rectus and P. intermedia were detected compared to P. nigrescens and A. actinomycetemcomitans in both groups ($P < 0.05$). The distribution of putative periodontal pathogens Fn, Pi, Cr, Pn, and Aa was similar in supragingival plaque in both groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** The data indicated that supragingival plaque samples presented significantly higher counts of Fn, Pi and Cr in heart transplant recipients, suggesting a possible role of these putative periodontal pathogens as a risk factor for the periodontal disease of heart transplant recipients.

【Keywords】 Heart transplant; Supragingival Plaque; Periodontal pathogens; Polymerase chain reaction

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81170282); 首都医科大学附属北京安贞医院院长科技发展基金资助项目(2012Z06)

作者单位: 100029 首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 口腔科(曹莹 吕亚林 韩笑 刘冬宇 丁芳) 心外科(贾一新)

通信作者: 吕亚林, 教授, 研究方向: 口腔疾病与心血管疾病的相关研究。E-mail: lyalin@vip.sina.com

心脏移植患者在术后需要长期服用免疫抑制剂,感染是危及其术后生命的主要危险因素之一^[1]。研究表明牙源性的感染可能加剧器官移植患者移植物的排斥反应,可能导致细菌性心内膜炎,还能引起危及生命的系统性感染^[2]。同时,由于服用免疫抑制的原因可能掩盖了疾病的症状,使感染呈快速进展^[2]。牙周病与全身健康关系密切,且牙

周病是牙源性感染的重要病因之一。Lessem 等^[3]的研究中发现 76% 的心脏移植患者都伴有不同程度的牙周疾病。Effie 等^[4]的研究发现心脏和肾脏移植患者牙周组织的破坏可能在移植器官的功能衰退和慢性排斥反应方面造成不良的影响。

作为口腔中细菌定植的生物膜,龈上菌斑和龈下菌斑中细菌的种类和分布之间存在密切关系,检测龈上菌斑中牙周可疑致病菌的分布对于牙周疾病的预防和治疗有着重要的指导意义^[5]。本研究是在前期工作的基础上通过检测心脏移植患者龈上菌斑中 5 种牙周可疑致病菌:具核梭杆菌(*fusobacterium nucleatum*, Fn)、中间普氏菌(*prevotella intermedia*, Pi)、变黑普氏菌(*Prevotella nigrescens*, Pn)、伴放线放线杆菌(*actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa)、直肠弯曲菌(*campylobacter rectus*, Cr)进一步探讨龈上菌斑中牙周可疑致病菌的分布状况,以及这些牙周致病菌与心脏移植患者口腔检查结果之间的相关性。

资料与方法

1. 研究对象:心脏移植组病例来自首都医科大学附属北京安贞医院心外科,2013 年 6 月至 2014 年 12 月间,心脏移植术后定期复查的患者,经口腔检查排除牙周炎,对照组病例为同期就诊于北京安贞医院口腔科的 35 例牙周健康者。研究对象纳入标准:①无危重的全身系统性疾病,妇女无妊娠;②过去 6 个月内未进行过牙周治疗,3 个月内未服用过抗生素;③全口存留牙不少于 20 颗,无牙周炎,无明显咬合关系异常,无正畸治疗史;。对照组牙周健康者满足全口牙周探诊深度(probing depth, PD) ≤ 3 mm,无附着丧失,出血指数(bleeding index, BI) ≥ 2 的位点不超过 10%,无 BI = 4 的位点。本研究获得首都医科大学附属北京安贞医院医学伦理委员会的批准,所有研究对象均签署知情同意书。

2. 口腔检查和菌斑采集:口腔检查前嘱患者漱口清除食物残渣,选取 16, 26 为受检牙位,记录所有受检牙位的菌斑指数(debris index, DI)、牙石指数(calculus index, CI)、PD、BI、牙龈增生(gingival overgrowth, GO),1 周后选择取样位点收集龈上菌斑。

以 16, 26 近中颊侧为菌斑取样点,局部隔湿,用无菌刮治器刮取龈上集合菌斑。把收集的菌斑置于无菌 EP 管中,向 EP 管中加入 1 000 μ L TE 缓冲

液(10 mmol/L Tris-HCL, PH8.0, 1 mmol/L EDTA),充分震荡,13 000 r/min 离心 3 min,留取沉淀,再用同样方法清洗 2 次, -70℃ 冻存余留沉淀。菌斑采集和口腔检查均有同一研究者完成。

3. 聚合酶链反应(PCR)法检测牙周致病菌:

(1) 龈上菌斑 DNA 的提取:冻存样品在室温下溶解,漩涡振荡器上震荡均匀,应用上海华舜生物工程有限公司提供的小量细菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒进行 DNA 的提取,提取方法参照试剂盒操作手册。

(2) PCR 引物及扩增条件:五种牙周致病微生物引物来自编码 16S rRNA 的基因,参照文献设计引物序列^[6],引物由上海英俊生物技术有限公司(invitrogen)合成。五种细菌引物序列及产物片段长度见表 1。

(3) PCR 反应体系:总反应体系为 20 μ L,其中 2 μ L 模板,10xPCR Buffer 2 μ L, 25 mmol/L dNTP 混合物 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 20 pmol 上下游引物各 1 μ L, Taq 酶 1.25 U,用三蒸水调整 PCR 总反应体系为 20 μ L。

(4) PCR 反应条件:Fn 和 Cr 反应条件:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 热变性 60s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 36 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。Pi 反应条件:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 热变性 60s, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 36 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。Aa 和 Pn 反应条件:95℃ 预变性 2 min, 94℃ 热变性 30 s, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 36 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

(5) PCR 扩增产物检测:取 3 μ L 扩增产物,经 3% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色,在紫外检测仪(NTM-40, Fwnacoshi, Japan)下观察其特征性 DNA 区带并拍照。

4. 统计学方法:应用 SPSS17.0 软件对本组数据进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示,比较采用 *t* 检验;五种牙周致病菌检出率比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组受试者基本信息和牙周临床检查结果
心脏移植组 32 例,其中男性 27 例,女性 5 例,年龄 20 ~ 65 岁,平均年龄(45.4 \pm 11.5)岁。对照组 35 例,男性 29 例,女性 6 例,年龄 22 ~ 65 岁,平均年龄(44.8 \pm 12.5)岁。两组间人数、性别、年龄构成差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 引物序列及扩增产物片段大小

细菌	引物序列'	退火温度/℃	产物片段长度/bp
Fn	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	55	407
	5'-GTCATCGTGCACACAGAATTGCTG-3'		
Pi	5'-CGTGGACCAAAGATTTCATCGGTGGA-3'	57	259
	5'-CCGCTTTACTCCCCAACAAA-3'		
Pn	5'-ATGAAACAAAGGTTTTCCGCTAAG-3'	57	804
	5'-CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA-3'		
Aa	5'-AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'	57	557
	5'-ATGCCAACTTGACGTTAAAT-3'		
Cr	5'-TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC-3'	55	598
	5'-TTTCTGCAAGCAGACACTCTT-3'		

表 2 两组牙周临床检查结果 [$\bar{x} \pm s$ n (%)

组别	DI	CI	BI	PD/mm	GO
心脏移植组($n = 64$)	1. 97 \pm 0. 21*	0. 45 \pm 0. 09	2. 55 \pm 0. 15*	4. 31 \pm 0. 19*	12(18. 8)
对照组($n = 70$)	0. 69 \pm 0. 12	0. 38 \pm 0. 11	0. 65 \pm 0. 06	2. 32 \pm 0. 10	0

注: 与对照组比较 , * $P < 0. 05$

心脏移植组 DI、BI、PD 及 GO 均高于对照组 ,两组间差异有统计学意义($P < 0. 05$) ,CI 在两组间差异无统计学意义 ,见表 2。

2. 龈上菌斑五种牙周致病菌 PCR 检测结果见图 1。

3. 两组受试者五种牙周致病菌检出率的比较结果显示 ,两组受试者龈上菌斑中牙周可疑致病菌 Fn、Pi、Cr 的检出率均大于 80% ,Aa 的检出率较低 ,Fn、Pi、Cr 检出率均高于 Aa、Pn 的检出率($P <$

0. 05) ,五种牙周可疑致病菌在两组间的检出率差异无统计学意义($P > 0. 05$) 。牙周致病菌“橙色复合体”中 Fn ,Pn ,Pi 三种细菌联合检出率在两组中均 $> 30\%$,但两组间差异无统计学意义($P > 0. 05$,表 3) 。

讨 论

牙周疾病是心脏移植患者牙源性感染的主要来源之一^[7]。牙周疾病的发展取决于细菌和宿主之

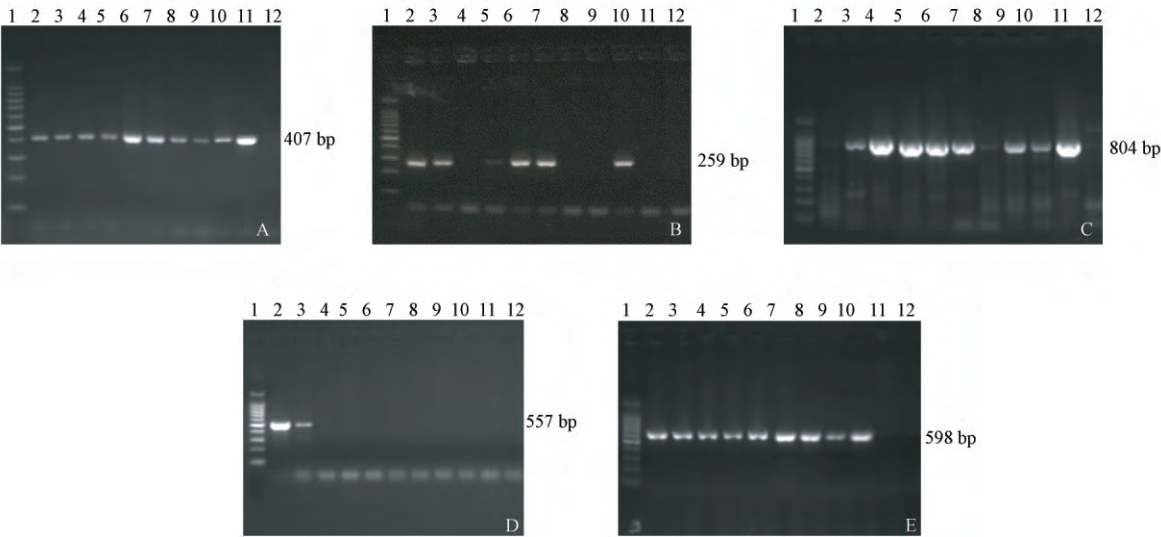


图 1 五种牙周可疑致病菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 产物电泳图 A: 龈上菌斑中 Fn PCR 扩增产物电泳图(407bp) 1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2-11. 心脏移植组龈上菌斑样本; 12. Fn 阴性对照; B: 龈上菌斑中 Pi PCR 扩增产物电泳图(259bp) 1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2-11. 心脏移植组龈上菌斑样本; 12. Pi 阴性对照; C: 龈上菌斑中 Pn PCR 扩增产物电泳图(804bp) 1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2-11. 心脏移植组龈上菌斑样本; 12. Pn 阴性对照; D: 龈上菌斑中 Aa PCR 扩增产物电泳图(557bp) 1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2-11. 心脏移植组龈上菌斑样本; 12. Aa 阴性对照; E: 龈上菌斑中 Cr PCR 扩增产物电泳图(598bp) 1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2-11. 心脏移植组龈上菌斑样本; 12. Cr 阴性对照

间的平衡,其中致病菌的数量、局部环境和宿主的易感性都起着至关重要的作用。心脏移植患者由于长期服用免疫抑制剂,机体处于免疫抑制状态,其自身的免疫反应和细菌致病力之间的平衡易被破坏,与正常人相比更容易发生口腔感染^[8]。

表 3 两组受试者 5 种牙周致病菌检出结果比较 [$n(\%)$]

牙周致病菌	心脏移植组($n=64$)	对照组($n=70$)	P 值
Fn407	62(96.9)*	64(91.4)*	0.278
Pi259	52(81.3)*	62(88.6)*	0.235
Pn804	24(37.5)	30(42.9)	0.528
Aa557	8(12.5)	6(8.6)	0.458
Cr598	60(93.8)*	68(97.1)*	0.425
Fn + Pi + Pn	20(31.3)	26(37.1)	0.473

注:与 Aa 和 Pn 比较,* $P < 0.01$

菌斑是龋病和牙周病共同的始动因素。众多国内外学者关于牙周病致病微生物的研究主要集中于龈下菌斑中病菌种类和构成分析^[9-11]。但近年来的研究结果表明在牙周炎患者和健康成人的龈上和龈下菌斑中均可以检测到牙周可疑致病菌,差别在于细菌的构成比例不同^[12]。这些研究结果提示龈上菌斑与牙周炎的发生和发展也存在着一定的关系^[13]。目前,国内外关于心脏移植患者龈上菌斑中牙周可疑致病菌的研究报道极少^[14]。本课题组的前期研究表明:与正常人群相比,心脏移植患者龈上菌斑中牙周致病菌红色复合体的检出率明显高于对照组($P < 0.05$),本研究是在前期工作的基础上进一步分析五种常见牙周可疑致病菌在心脏移植患者龈上菌斑中的分布情况。

本研究对不伴有牙周炎的心脏移植患者进行牙周检查,结果发现其 DI, BI 高于健康对照组($P < 0.05$)。这表明心脏移植患者的口腔卫生状况不良,部分患者已伴有牙龈炎。心脏移植组 PD 高于健康对照组($P < 0.05$),且近 20% 的心脏移植患者伴有牙龈增生,牙龈增生是心脏移植患者服用免疫抑制剂环孢菌素的副作用之一^[15],牙龈增生的发生与机体对药物的敏感性有关,同时受口腔卫生和牙龈炎症程度的影响。本研究中筛选的是不伴有牙周炎的心脏移植患者,其牙周探针深度(PD)大于对照组的原因可能与这部分患者的牙龈炎症和牙龈增生密切相关。由牙周检查结果来看,心脏移植患者不良的口腔卫生状况、牙龈炎症和牙龈增生三者之间可能存在互相促进的关系。

对两组受试者龈上菌斑进行牙周可疑致病菌: Aa、Fn、Pn、Pi 及 Cr 的检测,发现:①每种牙周致病

菌在两组间的检出率接近,说明五种牙周可疑致病菌在两组人群的龈上菌斑中均有分布;②Fn、Pn、Cr 在两组中的检出率均 $> 80\%$,但 Aa 的检出率较低(HT 组 12.5% / 对照组 8.6%),提示不同牙周可疑致病菌在龈上菌斑中的分布呈不均衡性。

Fn、Pi、Pn 是与牙周炎紧密相关“橙色复合体”中三种主要牙周致病菌。研究表明:具核酸杆菌(Fn)检出数量、频率与牙周组织的炎症、破坏程度之间呈正相关^[16]。Fn 是龈上菌斑、龈下菌斑及牙周袋等口腔感染部位的优势菌,Fn 具有很强的黏附能力,能够与牙周致病菌红色复合体细菌发生共聚^[17],同时也能与 Aa 发生共聚,其广泛的共聚能力被认为在牙菌斑成熟的过程中起重要作用。在本研究检测的五种牙周可疑致病菌中,Fn 在两组中的检出率最高,分别为 96.9%(62/64)、91.4%(64/70),且 Fn 的检出率不受两组间口腔卫生和牙龈炎症程度的影响。心脏移植患者龈上菌斑中 Fn 的广泛分布可能为其他牙周致病菌的附着提供了基础,并促进牙周炎的发生和发展。

中间普氏菌(Pi)与中度或重度牙龈炎、急性坏死性溃疡性牙龈炎、妊娠期牙龈炎、慢性牙周炎、坏疽性口炎(走马疳)和儿童肺部感染有关^[18]。Pi 通过直接侵袭口腔组织细胞、促炎症因子的释放、干扰宿主免疫反应、抑制骨形成促进骨吸收等作用而参与牙周炎的发生发展。Pn 是 Pi 中的一种,以往研究表明 Pn 与正常牙龈和牙髓炎有关,是人口腔内的正常菌群,在健康部位和病变部位的检出率相同^[19]。在牙周致病菌橙色复合体中,相对于 Pn 而言,Fn 和 Pi 与牙周疾病的发生发展的关系更为紧密,本研究发现两组中 Fn 和 Pi 检出率明显高于 Pn 的检出率($P < 0.05$),对于心脏移植患者而言,龈上菌斑中 Fn 和 Pi 的高频分布增加了其发生牙周疾病的风险。

伴放线放线杆菌(Aa)与侵袭性牙周炎有高度相关性^[20],是目前公认的证据充分的主要牙周致病菌之一,以往关于 Aa 在龈下菌斑中的检出率,国内外研究结果差异较大^[11, 20-21]。本研究检测了 Aa 在龈上菌斑中的分布状况,在心脏移植患者龈上菌斑中 Aa 的检出率为 12.5%(8/64),略高于牙周健康组中 Aa 的检出率(8.6%,6/70),但两组间差异尚差异无统计学意义。本研究中心心脏移植患者口腔卫生较差,伴有一定程度的牙龈炎及牙龈增生,其龈上菌斑中 Aa 的存在可能促进了心脏移植患者罹患牙周疾病的风险。

Ximénez-Fyvie 等^[12]对牙周炎和健康成人的龈

上和龈下菌斑进行研究,发现在两组人群的龈上和龈下菌斑中均可检测出多种牙周致病菌,牙周致病菌红色复合体和橙色复合体在牙周炎个体和龈下菌斑中的比例更高。本课题组前期研究发现心脏移植组龈上菌斑中牙周致病菌红色复合体检出率为 53.9%,在本研究中心心脏移植组牙周致病菌橙色复合体($F_n + P_i + P_n$)在心脏移植组中的检出率高于 30%,上述研究结果表明在心脏移植患者龈上菌斑中有多种牙周可疑致病菌(如:红色复合体、橙色复合体等)共同存在,且各种细菌的分布存在差异。心脏移植患者由于机体免疫抑制和口腔局部因素(口腔卫生较差、伴有牙龈炎、牙龈增生等)的影响增加了其牙周炎发生发展的风险,其龈上菌斑中定植的多种牙周致病菌可能在牙周病的发生发展中发挥着重要的作用。由于龈上菌斑与龈下菌斑关系密切,为更好的阐释牙菌斑在心脏移植患者牙周疾病中的作用,有必要对心脏移植患者龈下菌斑细菌种类和构成进行进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Shetty K, Gilbert K. Dental considerations in the management of the cardiac transplant patient. *Gen Dent*, 2008, 56: 727-732.
- [2] Meyer UI, Weingart D, Deng MC, et al. Heart transplants—assessment of dental procedures. *Clin Oral Investig*, 1999, 3: 79-83.
- [3] Lessem J, Drisko C, Greenwell H, et al. Are cardiac transplant patients more likely to have periodontitis? A case record study. *J Int Acad Periodontol*, 2002, 4: 95-100.
- [4] Ioannidou EI, Kao D, Chang N, et al. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) in solid-organ transplant recipients is positively associated with tissue destruction and IL-6 gene expression in the periodontium. *J Periodontol*, 2006, 77: 1871-1878.
- [5] Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra-and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2000, 27: 722-732.
- [6] polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced. *Oral Microbial Immu*, 1996, 11: 266-273.
- [7] Vasanthan A, Dallal N. Periodontal treatment considerations for cell transplant and organ transplant patients. *Periodontol* 2000, 2007, 44: 82-102.
- [8] Nappalli D, Lingappa A. Oral manifestations in transplant patients. *Dent Res J (Isfahan)*, 2015, 12: 199-208.
- [9] Haririan H, Andrukhov O, Bertl K, et al. Microbial analysis of subgingival plaque samples compared to that of whole saliva in patients with periodontitis. *J Periodontol*, 2014, 85: 819-828.
- [10] Ardila CM, López MA, Guzmán IC. Positive correlations between presence of gram negative enteric rods and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque. *Acta Odontol Latinoam*, 2011; 24: 15-19.
- [11] 周婷,徐屹,丁一,等.慢性牙周炎龈下菌斑中五种牙周可疑致病微生物的分布. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25: 470-473.
- [12] Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000, 27: 648-657.
- [13] 吴明桃,刘莹,漆正楠,等.慢性牙周炎患者龈下菌斑和龈上菌斑生物群落分析. *临床口腔医学杂志*, 2015, 31: 649-651.
- [14] 曹莹,吕亚林,贾一新.心脏移植患者 3 种牙周可疑致病菌的检测. *口腔医学研究*, 2014, 30: 519-522.
- [15] Maddi A, Alluri LS, Ciancio SG. Management of gingival overgrowth in a cardiac transplant patient using laser-assisted gingivectomy/gingivoplasty. *J Int Acad Periodontol*, 2015, 17: 77-81.
- [16] Checchi L, Gatto MR, Checchi V, et al. Bacteria prevalence in a large Italian population sample: a clinical and microbiological study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016, 30(2 Suppl 1): 199-208.
- [17] Polak D, Shapira L, Weiss EI, et al. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol*, 2012, 39: 617-625.
- [18] Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF, et al. Occurrence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in relation to gingivitis and gingival health. *J Clin Periodontol*, 2001, 28: 189-193.
- [19] 吴波,章锦才,黄萍,等.变黑普里沃菌在成人牙周炎患者龈下菌斑中的分布. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2001, 11: 166-168.
- [20] Flemmig TF, Rüdiger S, Hofmann U, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 3102-3105.
- [21] 刘冬宇,丁芳,曹莹,等.颈动脉粥样硬化斑块中牙周可疑致病菌的检测. *心肺血管病杂志*, 2013, 32: 186-189.

(2016-10-13 收稿)