

文章编号: 1001-764X(2009)01-0040-03

中图分类号: R446.5

文献标识码: A

· 实验研究 ·

用 16Sr RNA 序列分析技术检测龈下菌斑中致病菌*

符义富^a, 傅尧^a, 李兵^a, 游丽萍^a, 曾以周^b, 周炳荣^b, 杨卫东^c (南京市口腔医院 a 检验科, b 外科, c 内科, 南京 210008)

摘要:目的 建立牙周致病菌的 16SrRNA 序列分析方法, 检测龈下菌斑菌群的分布。方法 对 376 例牙周病患者 (其中成年组 306 例、儿童组 70 例) 龈下菌斑, 采用 Chelex-100 法提取细菌 DNA, 16SrRNA 序列分析技术检测牙龈卟啉单胞菌 (Pg)、伴放线嗜血杆菌 (Aa)、福赛斯坦纳菌 (Tf)、具核梭杆菌 (Fn)、中间普氏菌 (Pi) 等 5 种牙周炎相关致病菌。结果 376 例牙周病患者龈下菌斑中 5 种牙周炎相关致病菌 PCR 法与培养法检出率分别为 Pg (40.96%, 17.82%)、Aa (19.15%, 9.31%)、Tf (88.56%, 27.66%)、Fn (81.91%, 23.67%)、Pi (57.98%, 19.15%); 除 Aa 外前者检出率明显高于后者 ($P < 0.01$)。结论 16SrRNA 序列分析法具有检出率高、稳定性好以及高度的特异性和敏感性, 是一种比较适合临床应用的牙周菌斑检测方法。

关键词: 16SrRNA 序列; 牙周致病菌; 厌氧菌; 洁悠神长效抗菌材料

口腔与呼吸道、消化道相通, 有厌氧菌和需氧菌混合寄生, 牙及牙周组织的特殊解剖结构有利于细菌生长繁殖, 导致感染发生。流行病学研究显示, 20% ~ 50% 的牙周致病菌为螺旋菌^[1]。龈下菌斑中的微生物及其代谢产物是引发牙周炎的始动因子。主要的牙周致病菌包括牙龈卟啉单胞菌 (*Prophomonas gingivalis*, Pg)、伴放线嗜血杆菌 (*Actinobacillus actinomyces comitans*, Aa)、福赛斯坦纳菌 (*Tannerella forsythia*, Tf)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn)、中间普氏菌 (*Prevotella intermedia*, Pi) 5 种。在以往的牙周病原菌的研究中, 由于分离鉴定比较困难, 这些病菌很长时间一直难以检测。本研究用 16SrRNA 序列分析技术检测牙周病患者龈下菌斑细菌的变化, 了解龈下菌斑中致病菌群分布趋势, 为临床防治感染提供参考。

1 材料与方 法

1.1 临床资料 2005 年 5 月 ~ 2007 年 8 月在本院门诊治疗的经本院牙周科医师确诊为慢性牙周炎 (CP), 均愿接受洁悠神物理抗菌喷雾敷料治疗的患者 376 例, 分为 2 组: 成年组: 306 例, 男性 152 例, 女性 154 例, 年龄 35 ~ 60 岁; 儿童组: 70 例, 男性 36 例, 女性 34 例, 年龄 7 ~ 12 岁。

1.2 主要试剂及设备 GENbox anaer REF124 厌氧培养箱 (法国梅里埃公司), REF124 厌氧产气袋 (批号: 24B05-12)、REF 96 118 厌氧指示器 (批号: 08904B)、RTF 厌氧标本收集管购自德国 Merck

KGaA 公司, BSK 培养基 (英国 Oxoid 公司), 标准菌株 Pg (ATCC 33277)、Aa (ATCC 29523)、Tf (ATCC 43037)、Fn (ATCC 25586)、Pi (ATCC 25611) 购自美国 ScienceII 公司, Chelex-100 (Sigma 公司), PCR 试剂盒、蛋白酶 K 液 (上海生工公司), PCR 扩增仪 (PTC-200), 紫外分光光度仪 (Genequant pro 公司)。

1.3 标本采集 龈下菌斑标本均由本院牙周科医师收集。先用无菌生理盐水冲洗每例患者的病变位点 3 遍, 再用无菌龈上、下刮治器取牙齿上的菌斑, 1 份立即放入灭菌后的 RTF 肉汤培养管中, 加用无菌液体石蜡封闭; 1 份放入无菌 Eppendorf 管中, -70 保存。

1.4 细菌培养和鉴定 在严格持续的厌氧环境下, 将 RTF 管中标本用振荡器混匀 30 s, 以肉汤增菌液稀释, 选择稀释度为 10^{-3} 的浓度, 接种至加有 1.3 g/L 琼脂制成的 BSK 平板培养基中, 培养基置厌氧培养箱内 33 ~ 35 培养 1 周 (BSK 平板培养基在使用前于 95% N_2 , 5% H_2 环境中预还原 24 ~ 48 h)。根据菌落特征挑选单个菌落涂片作革兰染色和初步生化鉴定: Pg 为革兰阴性无芽胞球杆菌, 表面有纤毛, 黑色菌落, 触酶试验阴性, 吡啶试验阳性, 七叶苷试验阴性, 不发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖和纤维二糖; Aa 为革兰阴性短杆菌, 雪茄烟状菌落, 过氧化氢酶试验阴性, 分解葡萄糖、木糖产酸不产气, 还原硝酸盐; Tf 为革兰阴性梭形类杆菌, 粉红色或黑色斑点状菌落, 触酶试验阴性, 吡啶试验阴性, 七叶苷试验阳性, 不发酵葡萄糖; Fn 为革兰阴性无芽胞梭形杆

* 基金项目: 南京市科技计划项目 (编号: 200504019)。

作者简介: 符义富, 1965 年生, 男, 学士, 从事临床检验工作。E-mail: fuyifu897@yahoo.cn。

通讯作者: 曾以周, 男, 主任医师 E-mail: doctord@163.com。

菌,边缘不齐的半透明菌落,触酶试验阴性,吲哚试验阳性,苏氨酸产丙酸盐试验阳性,葡萄糖、果糖弱发酵反应;Pi为革兰阴性杆菌,溶血菌落,触酶试验阳性,吲哚试验阳性,发酵葡萄糖、蔗糖,不发酵纤维二糖、乳糖。

1.5 引物设计与合成 5种牙周致病菌的16S rRNA特异性引物序列设计参考文献^[2-5],上、下游引物的核苷酸序列 5'-3'、PCR扩增片段长度和退火温度分别是:龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌(Pg) TGTA GATGACTGATGGTGAAAACC 和 ACGTCA TC-CACACCTTCCTC^[2]、131 bp、58℃;伴放线嗜血杆菌(Aa) GCTAA TACCGCGTAGAGTCGT 和 ATTTCA-CACCTCACTTAAAGGT^[3]、235 bp、59.5℃;福赛斯坦纳菌(Tf) GTCGGACTAA TACCTCA TAAACA 和 TCGCCCA TTGACCAA TATT^[4]、419 bp、59.5℃;具核梭杆菌(Fn) GGCCACAA GGGGACTGAGACA 和 TT-TAGCCGTCACTTCTTCTGTTGG^[5]、185 bp、59.5℃;中间普氏菌(Pi) GTGCTTGACAT TCTGACGTCGAC 和 CGTCTGCAAT TCAAGCCCGGGYAAAG^[5]、367 bp、57℃。

1.6 细菌 DNA 的提取及 PCR 的方法 参照文献^[6],在含有牙周致病菌斑块的 Ep 管中加入 20 mg/ml蛋白酶 K液 4 μl和 5% Chelex-100液 150 μl,振荡 10 min混匀,取上清液 -20℃保存。PCR总反应体系为 22 μl:DNA模板(2 μl),1.5 mmol/L MgCl₂(1 μl),缓冲液(2 μl),10 mmol/μl dNTP(0.4

μl),10 pmol/μl引物 P1、P2各(0.8 μl),5 U/μl TaqDNA聚合酶(0.3 μl),其余用重蒸馏水补足。PCR反应条件:预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 30 s,退火温度(57~60℃)1 min,72℃延伸 1 min,共 35个循环后,最后 72℃再次延伸 2 min,4℃保存。PCR扩增产物对照的检测:取扩增产物 3 μl, Pg(ATCC 33277)、Aa(ATCC 29523)、Tf(ATCC 43037)、Fn(ATCC 25586)、Pi(ATCC 25611)标准株做阳性对照,不加任何模板的反应体系为空白对照。2 g/L琼脂糖(含 0.5 mg/L溴乙锭)凝胶电泳,电压 100V,以 pUC19DNA/MspI、DNA Marker DL2000为标准对照,紫外线检测仪观察扩增条带。

1.7 数据处理 用 SPSS 11.5统计软件,计量材料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本之间均数比较用 *t*检验;组间比较用方差分析。*P* < 0.05为差别有统计学意义。

2 结果

376例牙周病患者龈下菌斑中 5种牙周炎相关致病菌的 PCR法和培养法的总检出率分别为 Pg 40.96% (154/376)、17.82% (67/376), Tf 88.56% (333/376)、27.66% (104/376), Fn 81.91% (308/376)、23.67% (89/376), Pi 57.98% (218/376)、19.15% (72/376), PCR法检出率均高于培养法 (*P* < 0.01); Aa 19.15% (72/376)、9.31% (35/376), PCR法检出率虽高于培养法但无统计学意义 (*P* > 0.05)。儿童组与成人组两种方法各自的检出率见表 1。

表 1 儿童与成人患者龈下菌斑中 5种牙周炎相关致病菌 PCR和培养法的阳性结果

细菌	儿童组 (n=70)		成年组 (n=306)	
	PCR法 (+)株数 (%)	培养法 (+)株数 (%)	PCR法 (+)株数 (%)	培养法 (+)株数 (%)
牙龈卟啉单胞菌 (Pg)	22 (31.43)	8 (11.43)	132 (43.13)	59 (19.28)
伴放线嗜血杆菌 (Aa)	10 (14.28)	5 (7.14)	62 (20.26)	30 (9.80)
福赛斯坦纳菌 (Tf)	48 (68.57)	15 (21.43)	285 (93.13)	89 (29.08)
具核梭杆菌 (Fn)	44 (62.86)	13 (18.57)	264 (86.27)	76 (24.84)
中间普氏菌 (Pi)	31 (44.28)	9 (12.86)	187 (61.11)	63 (20.59)

3 讨论

牙周炎的发病机制是近年来的研究热点,目前研究着重于包括 Pg、Aa、Tf、Fn、Pi等牙周炎可疑致病菌。由于该菌群属于难以培养的厌氧螺旋菌,其分离鉴定程序十分繁琐,很长时间一直没有受到应有的关注。近年来 PCR和基因序列分析技术的发展应用,使得对牙周致病菌的研究摆脱了传统培养法的限制。16S rRNA基因克隆技术通过扩增各种细菌共有基因序列片段,分析代表不同菌种的克隆子

的数量计算各种细菌的相对数量,具有培养方法难以比拟的优势^[7]。本实验结果显示,除 Aa外,培养法的阳性检出率明显低于 PCR法 (*P* < 0.01),这是由于牙周炎相关致病菌的培养时间长、条件要求高,需要在严格持续的厌氧环境下操作,存在人为误差的机率大,而 PCR技术检测的是标本内螺旋菌的 DNA,有方法快速、敏感性高等优点。

本实验中检出率最高的是福赛斯坦纳菌 (Tf) (88.56%, 27.66%)和具核梭杆菌 (Fn) (81.91%,

23.67%)。Tf 主要的外膜蛋白基因为 pA 基因,此基因由 419bp 可读区与类似细菌脂蛋白的信号肽组成。Tf 外膜成分通过粘附,定植于宿主组织起细胞毒作用。Tf 还可以抑制 T 淋巴细胞增殖和中性粒细胞产生过氧化物,导致宿主抗菌能力下降。Fn 是口腔感染部位的优势菌,在与 Pg、Tf、Aa、链球菌等的混合感染中起协同作用。有学者认为 Tf 和 Fn 在慢性牙周炎中起主要作用,并且与早发性牙周炎、急性坏死性牙龈炎以及各种严重牙周损害的破坏性牙周病密切相关,其检测到的概率以及数量的多少可用作观察牙周疾病严重程度及监测治疗效果的指标^[8]。

本实验中各菌在儿童组的检出率均低于成人组,提示儿童患者慢性牙周炎的发病和进展可能与其特定的牙周结构和其他细菌感染有关,这有待进一步研究。

参考文献:

[1] Lenbariti B S, Mikx F H, van Palenstein H. Microscopic spirochete counts in untreated subjects with and without periodontal tissue de-

struction [J]. J Clin Periodontol, 1995, 22 (3): 235-239.

[2] Kimura S, Ooshima T, Takiguchi M, et al. Periodontopathic bacterial infection in childhood [J]. J Periodontol, 2002, 73 (1): 20-26.

[3] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions [J]. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11 (11): 266-273.

[4] Elter J R, Champagne C M E, Offenbacher S, et al. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease [J]. J Periodontol, 2004, 75 (6): 782-790.

[5] Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques: A controlled clinical and laboratory trial [J]. Periodont Res, 2004, 39 (6): 442-446.

[6] 刘华, 钟良军, 李生彪, 等. 牙周致病菌在冠心病患者龈下菌斑中的分布 [J]. 口腔医学研究, 2008, 24 (2): 141-142.

[7] 张守印, 张集, 叶长芸, 等. 用 16S rRNA 基因克隆文库研究腹泻粪便中菌群分布 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26 (3): 165-166.

[8] 闫福华, 郑瑜谦. 口腔螺旋菌与牙周炎 [J]. 口腔医学研究, 2008, 24 (2): 121-123.

(收稿日期: 2008-07-10, 修回日期: 2008-11-09)

(本文编辑: 杨林)

文章编号: 1001-764X(2009)01-0042-02

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

· 实验研究 ·

急性白血病患者血浆可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体检测的意义

孔晋星, 佟力, 何成禄 (昆明医学院第一附属医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 观察急性白血病患者血浆可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体 (sEPCR) 的变化及其临床意义。方法 用 ELISA 法检测 58 例急性白血病患者血浆 sEPCR, 与健康对照组比较。结果 对照组与患者治疗前、治疗中、复发期 sEPCR 的差异有统计学意义 ($F=25.509, P<0.05$), 与患者缓解期比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 出血组高于无出血组 ($P<0.05$), 急淋组与急非淋组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 急性白血病患者广泛存在血管内皮细胞损伤, 是白血病出血机制之一, sEPCR 在疾病缓解后明显下降, 复发时再度升高, sEPCR 水平与病情呈一致性变化。

关键词:急性白血病; 出血; 血管内皮细胞损伤; 血管内皮细胞蛋白 C 受体

急性白血病常伴有血管内皮损伤, 是白血病患者出血机制之一。血浆可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体 (sEPCR) 可作为血管内皮细胞损伤标志物, 但在急性白血病未见检测报道。本研究检测 58 例急性白血病患者各时期 sEPCR 浓度, 探索其临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 健康对照组: 20 例均为我院健康体检者。男 12 例, 女 8 例, 年龄 32~68 岁。无心、肝、肾等器质性病变, 抽血前 2 周内未服用任何药物。患者组: 共 58 例, 男 30 例, 女 28 例, 年龄 3~72

岁。均为我院血液科及儿科住院患者, 其中急性非淋巴细胞白血病 (ANLL) 37 例, 包括 M₂ 10 例, M₃ 5 例, M₄ 15 例, M₅ 7 例; 急性淋巴细胞白血病 21 例, 包括 L₁ 6 例, L₂ 15 例。白血病诊断参照血液病诊断及疗效标准^[1], ANLL M₃ 经全反式维甲酸治疗 (剂量为 30 mg/d), 非 M₃ 型按标准 DA 方案, ALL 按标准 VDP 方案治疗。43 例曾获得完全缓解 (CR), 9 例复发。对初诊 58 例, 治疗中 20 例, 缓解期 20 例, 复发 9 例进行检测。并将其分为无出血症状组 25 例, 有出血症状组 33 例。