

## 不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落的分子生态学特点

刘莉霞<sup>1</sup>, 陈琳<sup>2</sup> (<sup>1</sup>深圳市第二人民医院口腔科, 广东省深圳市 518035; <sup>2</sup>佳木斯市金爵齿科研究所, 黑龙江省佳木斯市 154002)

### 文章亮点:

- 1 玻璃离子水门汀释放的氟离子仅能被动增加牙齿的抗龋能力, 难以对致龋微生物产生直接抑制作用, 导致经玻璃离子水门汀充填后的牙体仍易发生继发龋现象。
- 2 传统上采用的微生物检测分析方法一般依据细菌形态、生理生化特性及免疫血清分型, 不但准确性差、费时费力, 而且由于牙菌斑内能够被培养、分离和纯化的细菌不到 50%, 若以此来代表牙菌斑内的复杂微生物群落将导致极大的误差。
- 3 实验创新性应用现代分子生态学技术考察不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落结构与重要致龋微生物种属的相对数量变化趋势, 较好地反映了牙菌斑内与致龋过程密切相关的复杂微生物群落。

### 关键词:

生物材料; 口腔生物材料; 儿童龋病; dmfs 指数; 变性梯度凝胶电泳; 荧光原位杂交; 实时定量 PCR; 群落多样性; 致龋微生物

### 主题词:

口腔; 牙菌斑; 生态学

### 摘要

**背景:** 玻璃离子水门汀充填的儿童牙体仍易发生继发龋现象, 与充填材料表面牙菌斑内复杂微生物群落具有密切关系, 而传统微生物学方法无法获知牙菌斑微生物的重要信息。

**目的:** 利用先进的现代分子生态学技术解析不同龋敏感儿童玻璃离子水门汀表面牙菌斑内微生物群落结构与重要致龋微生物的数量水平。

**方法:** 选择 3-5 岁儿童 24 名, 按乳牙龋失补牙面指数不同分为无龋组、中龋组和高龋组, 每组 8 名。采集各组儿童全口牙面菌斑, 利用变性梯度凝胶电泳进行微生物群落多样性分析与微生物种群鉴定, 利用荧光原位杂交考察致龋微生物 *Streptococcus* spp. 的数量分布, 利用实时定量 PCR 考察重要致龋菌 *Streptococcus mutans* 占总菌的相对数量。

**结果与结论:** 无龋组牙菌斑内微生物群落的多样性显著高于中龋组和高龋组 ( $P < 0.05$ ), 中龋组和高龋组中大量富集的某些微生物可能在龋病发展过程中起重要作用。3 组样本共检出 16 个微生物菌属, *Streptococcus* spp. 和 *Actinomyces* spp. 可能是高龋组中重要的致龋微生物。 *Streptococcus* spp. 和 *Streptococcus mutans* 在高龋组中所占比例显著高于无龋组和中龋组 ( $P < 0.01$ )。综合来看, 研究采用的分子生态学技术可以较好反映牙菌斑内与致龋过程密切相关的复杂微生物群落。

刘莉霞, 陈琳. 不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落的分子生态学特点[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(25): 4043-4050.

## Molecular ecology of microbial communities in dental plaques of different caries-susceptible children

Liu Li-xia<sup>1</sup>, Chen Lin<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Stomatology, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Jinjue Dental Institute of Jiamusi, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Children teeth filled with glass ionomer cement are still susceptible with secondary caries, which is in close relationship with complex microbial community in dental plaque on the surface of glass ionomer cement. Traditional microbial methods are incapable of getting important information towards dental plaque microbes.

**OBJECTIVE:** To analyze microbial community structure and numerical level of caries-induced microbes in dental plaque on the surface of glass ionomer cement for different caries-susceptible children.

**METHODS:** Twenty-four children (age: 3-5 years) were divided into the caries-free, caries-positive, and caries-active children groups by the decayed, missing and filled index. With eight individuals in each group, their dental plaques were sampled for microbial community analysis. Denaturing gradient gel electrophoresis was employed to make clear the microbial community diversity and species identity in dental plaque of the caries-free, caries-positive, and caries-active children groups. Fluorescent *in situ* hybridization was used to investigate the numerical level of the caries-induced microbe *Streptococcus* spp. Quantitative PCR was carried out to analyze relative quantity of *Streptococcus mutans* in total bacteria.

刘莉霞, 女, 1974 年生, 江苏省苏州市人, 汉族, 1997 年湖北医科大学毕业, 主治医师, 主要从事口腔内科研究。

通讯作者: 陈琳, 主治医师, 佳木斯市金爵齿科研究所, 黑龙江省佳木斯市 154002

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.25.019

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)25-04043-08

稿件接受: 2014-05-13

Liu Li-xia, Attending physician, Department of Stomatology, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

Corresponding author: Chen Lin, Attending physician, Jinjue Dental Institute of Jiamusi, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-05-13

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the caries-positive and caries-active children groups, microbial community diversity among samples was significantly higher in the caries-free group. Microbes abundant in the caries-positive and caries-active groups might act important roles in the development of caries. *Streptococcus* spp. and *Actinomyces* spp. might be important caries-induced microbes in the caries-active group. The ratios of *Streptococcus* spp. and *Streptococcus mutans* in total bacteria were significantly higher in the caries-free group than those in the caries-free and caries-positive groups. In summary, molecular ecology technologies can well reflect caries-related complex microbial community in dental plaque.

**Subject headings:** mouth; dental plaque; ecology

Liu LX, Chen L. Molecular ecology of microbial communities in dental plaques of different caries-susceptible children. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(25):4043-4050.

## 0 引言 Introduction

20世纪70年代以来, 玻璃离子水门汀(glass ionomer cement, GIC)的发明使口腔充填修复材料进入了一个高速发展时期。与磷酸锌水门汀、聚羧酸锌水门汀等传统口腔充填材料相比, GIC具有良好的生物相容性和较小的牙体刺激性。此外, GIC中具有较高的含氟量, 可与牙齿中羟基磷灰石发生置换反应生成氟磷灰石, 从而使其能够在黏结充填后长期释放氟离子, 提高牙齿的抗酸性并抑制继发龋的产生与发展<sup>[1]</sup>。但另一方面, GIC释放的氟离子仅能被增加牙齿的抗龋能力, 难以对致龋微生物产生直接抑制作用, 导致经GIC充填后的牙体仍易发生继发龋现象<sup>[2]</sup>。从根本上看, 这是由于口腔微生物对充填材料具有一定的黏附作用, 一段时间后在GIC材料表面形成了牙菌斑生物膜所造成。解析口腔充填材料(如GIC)表面牙菌斑生物膜内的微生物, 对理解龋病的发生发展过程具有重要意义。

以分布最广泛、发病率最高、危害最严重的儿童龋病为例, 牙菌斑内微生物菌群组成及存在水平与儿童龋病的发展过程有密切关系<sup>[3-5]</sup>。牙菌斑生物膜的微生物复杂性导致基于纯培养技术仅能鉴定其中极少数的可培养微生物。近年来, 现代分子生态学在揭示复杂微生物群落的行为机制方面显示出巨大的技术优势, 应用较多的技术包括变性梯度凝胶电泳、荧光原位杂交、实时定量PCR等<sup>[8-10]</sup>。在本实验中, 以上几种分子生态学技术被用于揭示儿童GIC表面牙菌斑内微生物群落结构和致龋微生物的数量变化趋势, 对探明儿童龋病的微生物致病因素具有重要意义。

表1 入选儿童基本情况

Table 1 Baseline data of the chosen children

编号	无龋组		中龋组		高龋组	
	年龄(岁)	龋失补牙面指数	年龄(岁)	龋失补牙面指数	年龄(岁)	龋失补牙面指数
1	5	0	4	4	5	12
2	5	0	5	5	3	11
3	3	0	3	4	5	12
4	3	0	4	6	3	8
5	4	0	3	5	5	27
6	4	0	5	4	4	9
7	3	0	5	5	5	18
8	5	0	3	6	4	14

## 1 对象和方法 Subjects and methods

**设计:** 体外检测实验。

**时间及地点:** 于2013年2月至11月在深圳市第二人民医院口腔内科实验室完成。

**对象:** 在深圳民办幼儿园选择3-5岁儿童24名, 其中男13名, 女11名, 口腔内均有GIC充填材料。根据WHO口腔健康调查基本方法第4版龋病诊断标准<sup>[11]</sup>, 按乳牙龋失补牙面指数(decayed, missing and filled, dmfs)不同分为无龋组(dmfs=0, n=8)、中龋组(dmfs=4-6, n=8)和高龋组(dmfs > 6, n=8), 所选儿童基本情况见表1所示。

所有入选儿童除龋外均无其他口腔疾病, 全身健康, 无全身系统性疾病及长期服药史(包括使用氟剂等), 取样前2周内未全身使用抗生素, 2 h内未进食。在样品采集过程中, 采用灭菌的滤纸纸尖采集GIC表面全口牙面菌斑, 利用1 mL PBS反复冲洗滤纸纸尖后分别在15 000 r/min下离心5 min(离心半径10 cm), 收集沉淀。利用1 mL PBS清洗沉淀, 在15 000 r/min下离心5 min(离心半径10 cm), 弃上清后将得到的牙菌斑样本分成2份, 置于-80 °C冻存。

**实验方法:**

**GIC表面牙菌斑微生物基因组DNA的提取:** 将每名儿童的1份牙菌斑样本自然融化后, 采用少量细菌基因组DNA快速抽提纯化试剂盒提取牙菌斑微生物的基因组DNA, 具体操作方法依据试剂盒的使用说明书。采用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测牙菌斑内微生物基因组DNA的提取效果。

**16s rDNA基因片段的PCR扩增:** 采用大多数细菌16s rDNA V6-V8区的通用引物进行PCR扩增。引物BSF968GC

## 不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落分子生态学实验的主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
PBS、小量细菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒	上海生工生物工程有限公司
PCR 梯度扩增仪	德国 Biometra 公司
Dcode™ 基因突变检测系统	美国 Biorad 公司
杂交炉	美国 Thermo 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司
荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒	大连宝生物工程有限公司

(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') 和 BSR1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3')<sup>[12]</sup>, 分别对应 16s rDNA 968-984 位和 1 385-1 401 位的核苷酸序列, 扩增片段长度约 470 bp。PCR 反应体系 (30  $\mu$ L) 如下: 10 $\times$ Ex Taq buffer (Mg<sup>2+</sup>) 3  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.5  $\mu$ L, 20 pmol/L 正反引物各 0.6  $\mu$ L, 模板 DNA 100 ng, Ex Taq 0.2  $\mu$ L, 加水补足至 30  $\mu$ L。PCR 反应程序采用降落 PCR: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 每个循环退火温度降低 0.1  $^{\circ}$ C 直至 51.5  $^{\circ}$ C, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增效果。

**PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳:** 采用 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳检测。其中配制的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%。变性剂浓度为 30% 到 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物)。取 PCR 扩增产物 5  $\mu$ L 和等量上样缓冲液混合后加入上样孔, 在电泳温度 60  $^{\circ}$ C 条件下, 150 V 电压下电泳 6 h, 电泳结束后, 利用 0.1% 硝酸银溶液对凝胶进行银染染色, 利用透射扫描仪进行染色后的凝胶扫描以获取变性梯度凝胶电泳图谱。

**变性梯度凝胶电泳图谱目的条带的克隆测序:** 切取变性梯度凝胶电泳图谱上的目的条带, 提取其中的 DNA, 作为 PCR 的模板进行 PCR 扩增。采用上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收试剂盒进行 PCR 产物纯化, 连接到 PMD-19T 载体上进行克隆测序, 测序过程由上海生工生物工程有限公司完成。测序结果提交至 GenBank 数据库, 利用 Blastn 算法进行测序结果的序列比对, 确定各个条带所代表微生物的菌属信息。

**GIC 表面牙菌斑内微生物群落的荧光原位杂交分析:** 选取每名儿童的另一份牙菌斑样品, 利用 *Streptococcus* spp. 特异性探针 STR405 (5'-TAC CCG TCC CTT TCT GGT-3', Cy5 标记, 红色) 和细菌通用探针 EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3', FITC 标记, 绿色) 进行牙菌斑内微生物群落的荧光原位杂交分析<sup>[13]</sup>。将牙菌斑样品置于含 40 g/L 多聚甲醛的 PBS 中 4  $^{\circ}$ C 固定 12 h。在 37  $^{\circ}$ C 条件下, 利

用 5 mg/L 蛋白酶 K 和 1.5 g/L 溶菌酶将牙菌斑样品处理 30 min, 以增加细胞的通透性。将牙菌斑样品移至载玻片上自然干燥, 利用 -20  $^{\circ}$ C 预冷的梯度乙醇 (体积分数 50%, 80%, 95%, 100%) 依次脱水。将 2 种探针各 100 ng 加入 20  $\mu$ L 杂交液中 (含 0.9 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、体积分数 25% 甲酰胺、体积分数 0.1% SDS, pH 7.2), 滴于载玻片上牙菌斑样品处。将载玻片放置于湿盒内, 在杂交炉内 46  $^{\circ}$ C 杂交 2 h。利用洗脱液 (含 20 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、159 mmol/L NaCl、体积分数 0.1% SDS, pH 7.5) 洗脱掉多余探针, 在荧光显微镜下进行观测。

**GIC 表面牙菌斑微生物中 *Streptococcus mutans* 与总菌的定量 PCR 分析:** 利用基于 SYBR Green 的定量 PCR 进行牙菌斑微生物中致龋微生物 *Streptococcus mutans* 与总菌的相对定量分析。针对变形链球菌的引物为 SMF (5'-GCC TAC AGC TCA GAG ATG CTA TTC T-3') 和 SMR (5'-GCC ATA CAC CAC TCA TGA ATT GA-3'), 针对总菌的引物为 BSF (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 和 BSR (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3')<sup>[14]</sup>, 扩增产物长度分别为 118 bp 和 196 bp。实时 PCR 过程利用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行, 反应体系为: 总体积 20  $\mu$ L, 包含 SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol/L 引物各 0.2  $\mu$ L, 模板 DNA 0.5  $\mu$ L, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, 加灭菌去离子水至 20  $\mu$ L。将上述体系置于 96 孔板, 置于 ABI 7500 FAST 实时定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。PCR 扩增标准程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 31 s, 共 40 个循环。每个反应重复 3 次取荧光强度平均值, 进而确定变形链球菌与总菌的相对数量。

**数据分析:** 采用 quantity one 4.6 软件进行变性梯度凝胶电泳图谱条带和荧光原位杂交图谱的数字化处理, 采用 Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 多样性指数表征牙菌斑内微生物的菌群丰度。利用 SPSS 17.0 软件对不同龋敏感儿童微生物指标的组间比较进行 Newman-Keuls 检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 不同龋敏感儿童 GIC 表面牙菌斑内微生物群落结构分析** 采用变性梯度凝胶电泳技术分析不同龋敏感儿童牙菌斑内的微生物群落结构, 结果如图 1-3 所示。结果表明: 无龋组、中龋组和高龋组牙菌斑样品经变性梯度凝胶电泳分析后均分离出数目不等的电泳条带, 每个独立分离的条带可认为是一个操作分类单元 (operational taxonomy unit, OTU)。无龋组儿童牙菌斑样品分离出的微生物群落优势菌属为 37 个 OTUs, 显著高于中龋组 (24 个 OTUs) 和高龋组 (21 个 OTUs), 说明无龋组牙菌斑样品中微生物种类显著多于中龋组和高龋组。对这 3 组牙菌斑样品中, 变性梯度凝胶电泳图谱显示均出现了某些微生物的大量富集现象。

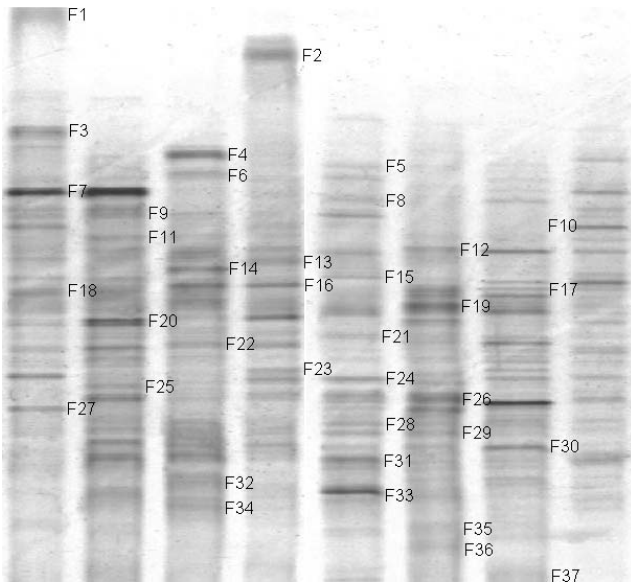


图1 无龋组儿童牙菌斑内微生物群落的变性梯度凝胶电泳图谱  
Figure 1 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of microbial community of dental plaque in the caries-free children group

图注: 无龋组儿童牙菌斑样品分离出的微生物群落优势菌属为 37 个操作分类单元。

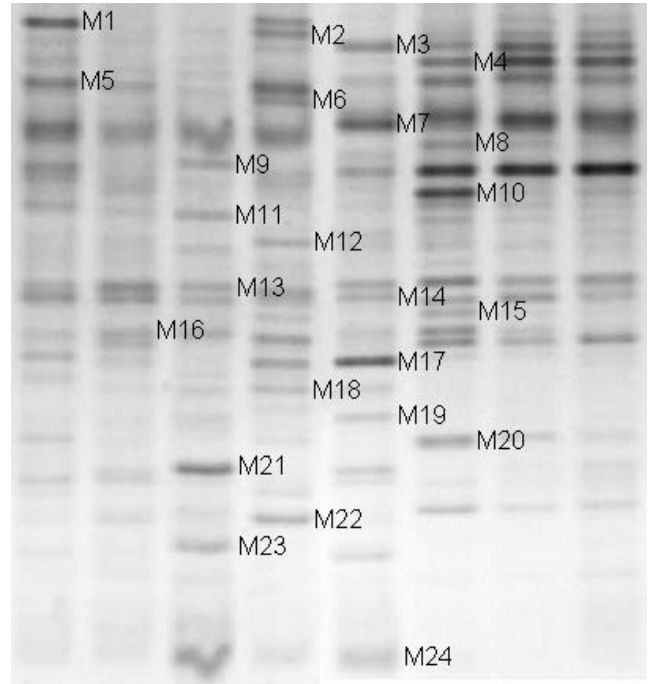


图2 中龋组儿童牙菌斑内微生物群落的变性梯度凝胶电泳图谱  
Figure 2 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of microbial community of dental plaque in the caries-positive children group

图注: 中龋组儿童牙菌斑样品分离出的微生物群落优势菌属为 24 个操作分类单元。

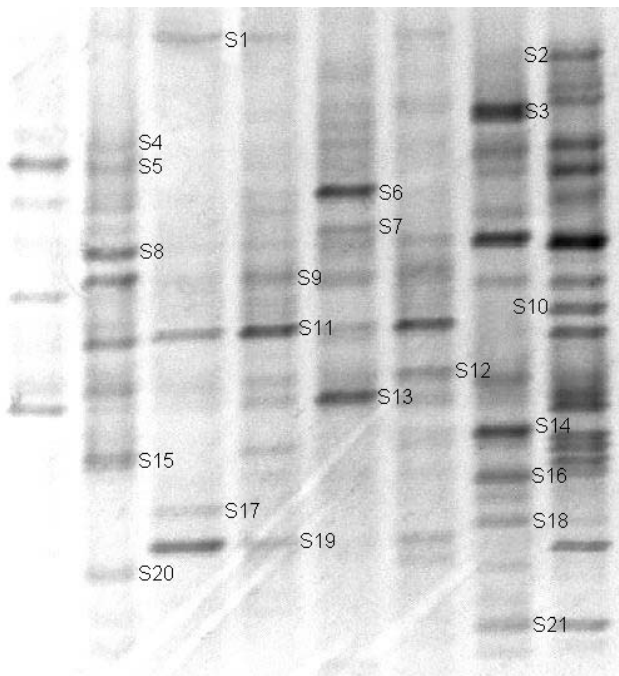


图3 高龋组儿童牙菌斑内微生物群落的变性梯度凝胶电泳图谱  
Figure 3 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of microbial community of dental plaque in the caries-active children group

图注: 高龋组儿童牙菌斑样品分离出的微生物群落优势菌属为 21 个操作分类单元。

表3 各组儿童牙菌斑样品变性梯度凝胶电泳图谱条带的测序比对结果

Table 3 Alignment results of denaturing gradient gel electrophoresis bands of the caries-free, caries-positive, and caries-active children groups

条带编号	最相似的微生物菌属	相似性(%)
F1,F2,S1,S2	<i>Leptotrichia</i> spp.	99,98,97,95
F3,M1,M2,M3,S3	<i>Gemella</i> spp.	98,98,99,97,97
F4,F5,F6,F13,M4,M6,S5	<i>Rothia</i> spp.	97,94,100,98,100,97,97
F7,F9,F13,M5,M8,M9	<i>Campylobacter</i> spp.	100,97,99,96,99,94
F8,F12,F16,S4,S6	<i>Prevotella</i> spp.	97,99,100,94,100
F10,M7	<i>Moraxella</i> spp.	96,99
F11,F14,M10,M11,S7,S8,S10	<i>Actinomyces</i> spp.	95,98,94,96,100,95,97
F15,F17,M12,S9	<i>Veillonella</i> spp.	96,98,100,94
F18,F21,M13,M14,S11,S12,S13	<i>Streptococcus</i> spp.	95,99,94,99,97,98,99
F19,F22,F23,S14	<i>Megasphaera</i> spp.	100,94,97,99
F20,F26,F28,M15,M18,S17	<i>Haemophilus</i> spp.	94,95,97,99,100,96
F24,F25,F27,F29,F31,F33,M19,M20,M21,S15,S16,S20	<i>Neisseria</i> spp.	98,94,97,100,99,96,100,97,94,98,99,94
F30,F32,M16	<i>Selenomonas</i> spp.	98,99,96
F34,M17,M22,S18,S19	<i>Lactobacilla</i> spp.	95,98,94,96,100
F35,F36,M23	<i>Eubacterium</i> spp.	97,99,95
F37,M24,S21	<i>Atopobium</i> spp.	96,96,98

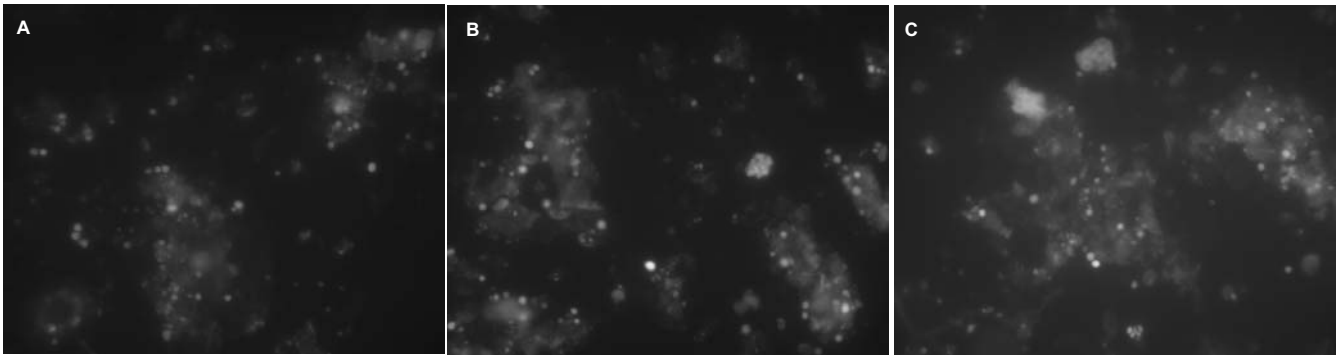


图4 不同龋敏感儿童牙菌斑内某一样本牙菌斑微生物群落荧光原位杂交图谱

Figure 4 Fluorescent *in situ* hybridization profile of microbial community of dental plaque in one sample of the caries-active group

图注: 图中 A 为无龋组, B 为中龋组, C 为高龋组。高龋组中 *Streptococcus* spp. 占总菌的比例最高, 之后为中龋组, 无龋组中 *Streptococcus* spp. 占总菌的比例较低。

表2 各组儿童牙菌斑样品变性梯度凝胶电泳图谱的条带数量、Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 多样性指数  
Table 2 Band numbers, Shannon-Wiener diversity indexes, and Simpson diversity indexes of DGGE profiles on dental plaque samples of the caries-free, caries-positive, and caries-active groups ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

项目	无龋组	中龋组	高龋组
条带数目	18.25±1.49	13.88±1.96	7.44±4.10
Shannon-Wiener 多样性指数	2.503±0.241	2.163±0.238	1.630±0.424
Simpson 多样性指数	0.872±0.059	0.834±0.061	0.719±0.101

**2.2 不同龋敏感儿童GIC表面牙菌斑内微生物群落多样性分析** 为考察不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落多样性, 考察了无龋组、中龋组和高龋组牙菌斑样品变性梯度凝胶电泳图谱的条带数量、Shannon-Wiener多样性指数和Simpson多样性指数, 见表2所示。可知无龋组、中龋组和高龋组3个组别中, 无龋组具有最多的条带数目, 最高的Shannon-Wiener多样性指数和Simpson多样性指数, 说明无龋组牙菌斑内微生物群落的多样性最高, 微生物菌群种类最为丰富。高龋组的条带数目最少, Shannon-Wiener多样性指数和Simpson多样性指数在3组中最低。统计学分析表明3组间条带数量、Shannon-Wiener多样性指数和Simpson多样性指数的差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 不同龋敏感儿童GIC表面牙菌斑内微生物功能菌群鉴定** 通过将变性梯度凝胶电泳图谱上条带的测序结果提交至Genbank进行Blastn比对, 得到了变性梯度凝胶电泳图谱上各个条带所对应的微生物菌属信息, 见表3所示。如表可知, 所有条带的比对结果与数据库中序列的相似度不低于94%, 因此可以确定这些条带代表的微生物菌属。3组样本的变性梯度凝胶电泳条带共检出16个微生物菌属, 这些菌属在无龋组中均有检出。中龋组和高龋组分别检出13个和12个微生物菌属。在无龋组中检出较多的微生物菌属为*Rothia* spp., *Megasphaera* spp., *Haemophilus* spp. 和*Neisseria* spp., 中龋组中检出较多的微生物菌属为

*Gemella* spp., *Campylobacter* spp.和*Neisseria* spp., 高龋组中检出较多的微生物菌属为*Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp.和*Neisseria* spp.。

**2.4 不同龋敏感儿童GIC表面牙菌斑内链球菌属数量分布** 图4分别显示无龋组、中龋组和高龋组中某一样本牙菌斑微生物群落的荧光原位杂交图谱, 如图可知, 高龋组中*Streptococcus* spp. 占总菌的比例最高, 之后为中龋组, 无龋组中*Streptococcus* spp. 占总菌的比例较低。通过分析荧光原位杂交图谱上不同颜色的荧光面积, 得到*Streptococcus* spp. 占总菌的数量比例, 高龋组*Streptococcus* spp. 占总菌比例达到(37.60±7.85)%, 之后是中龋组的(18.40±4.64)%, 无龋组*Streptococcus* spp. 占总菌比例仅为(11.30±2.68)%, 统计学分析表明*Streptococcus* spp. 占总菌比例的组间差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

**2.5 不同龋敏感儿童牙菌斑内*Streptococcus mutans* 占总菌相对数量** 无龋组中*Streptococcus mutans* 占总菌的相对数量最为(2.38±1.24)%, 之后为中龋组(5.35±0.97)%, 高龋组中*Streptococcus mutans* 占总菌的数量可达(11.92±5.63)%, 统计学分析表明*Streptococcus mutans* 占总菌比例的组间差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论 Discussion

龋病是一种由牙菌斑内包括致龋菌在内的多种细菌共同作用而导致的慢性感染性疾病。口腔内具有适宜的温度、湿度和丰富的营养来源, 为口腔内多种微生物的生长繁殖提供了适宜环境, 造成了口腔微生物的多样性与复杂性<sup>[15-17]</sup>。研究表明口腔中大约寄居着700多种细菌, 这些微生物在口腔不同部位生长、发育、衰亡, 并进行复杂的物质代谢与能量代谢活动, 其微生物群落结构演替与致龋菌的数量变化导致了龋病的发生和发展过程<sup>[18-20]</sup>。在进行龋病预防、治疗、病因分析及疗效巩固时, 准确快速地检测牙菌斑内微生物群落的多样性和动态性, 进而探明导致龋病发生发展并影响预后转归的微

生物特性成为预防及治疗龋病的重中之重<sup>[21-22]</sup>。传统上采用的微生物检测分析方法一般依据细菌形态、生理生化特性及免疫血清分型,不但准确性差、费时费力,而且由于牙菌斑内能够被培养、分离和纯化的细菌不到50%,若以此来代表牙菌斑内的复杂微生物群落将导致极大的误差。近年来,现代分子生态学逐步发展,并被引入到口腔微生物生态学研究,通过有效解析口腔内复杂微生物群落与重要的功能微生物菌群,将口腔微生物学研究领域带入了一个革命性的新时代<sup>[23-30]</sup>。

在龋病形成的病因机制方面,目前存在3个学说,即菌斑特异性假说,非菌斑特异性假说和菌斑生态假说<sup>[31]</sup>。菌斑特异性假说提出只有少数特异性菌种,如*Streptococcus mutans*和*Streptococcus sobrinus*在龋病发展中起积极的作用,非菌斑特异性假说主张龋是多种较活跃的细菌共同作用的结果,而菌斑生态假说则认为与龋相关的细菌基本都是口腔正常菌群,因局部口腔环境变化致使微生态失衡,从而成为条件致病菌而引起龋病<sup>[32-33]</sup>。本实验通过分子生态学技术发现:在牙菌斑中不是单独一种特异细菌,而是一组微生物功能菌群与龋病的发生有显著性关系。牙菌斑中多种细菌相互作用,使整个微环境从平衡向生态失调发展,最终形成龋病。

在本实验中,通过对不同龋敏感儿童牙菌斑内微生物群落的变性梯度凝胶电泳分析,以及基于变性梯度凝胶电泳图谱的条带数量,Shannon-Wiener多样性指数和Simpson多样性指数分析,可以发现无龋组儿童牙菌斑样品内微生物群落结构最为复杂,具体表现为微生物多样性丰富,大多数菌群在微生物群落中的相对数量较少,而中龋组和高龋组的微生物群落较为简单,这个研究与之前研究结论相一致,Li等<sup>[34]</sup>采用变性梯度凝胶电泳技术研究了重症早期龋患儿口腔中微生物群落结构,结果表明相对于重症早期龋患儿,无龋儿童菌斑中微生物群落结构更加复杂。刘怡然等<sup>[35]</sup>采用变性梯度凝胶电泳技术检测早期儿童龋治疗前后口腔菌群多样性。结果表明治疗前唾液样本变性梯度凝胶电泳条带数显著少于治疗后,且该差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。以上研究表明,种群类型丰富的牙菌斑微生物群落往往不会导致龋病的发生。

另一方面,若多种微生物在牙菌斑内保持的动态平衡被打破,微生物类群之间原有的种间协同或拮抗作用逐渐减弱,此时即会导致微生物菌群失调,使其中的致龋菌等微生物大量富集,从而使此处位点向龋病状态转化<sup>[36]</sup>。在本实验中,中龋组和高龋组样品中均出现了某些微生物的大量富集作用,这些微生物可能在龋病的发生发展过程中起关键作用。从口腔微环境改变的角度而言,龋病的进展过程中牙菌斑会逐渐酸化。随着牙菌斑pH值的不断降低,只有能耐受低pH值的细菌能在酸性条件下存活而不断增殖,这些微生物往往具有利用碳水化合物进行产酸的能力,

进一步加速了龋病的发展过程<sup>[37]</sup>。

通过对变性梯度凝胶电泳图谱的序列测定及比对,可以得知其中与龋病发展过程密切相关的功能微生物。*Streptococcus spp.*和*Actinomyces spp.*在高龋组中大量存在,可能是导致龋病的关键微生物种群。而在荧光原位杂交图谱中,*Streptococcus spp.*在无龋组、中龋组和高龋组中数量比例亦呈现逐渐升高的趋势。研究表明:*Streptococcus spp.*为革兰阳性产酸菌,能很快酵解糖产酸,由于其产酸速度较口腔中其他细菌快,因而一直以来的研究都认为*Streptococcus spp.*与龋病关系密切<sup>[38-39]</sup>。此外,其中的*Streptococcus spp.*中的*Streptococcus oralis*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus sobrinus*、*Streptococcus mutans*等常被认为是口腔中最早定植的“先锋菌”,这些链球菌菌种亦具有相应的致龋能<sup>[40]</sup>。在*Actinomyces spp.*中,*Actinomyces viscosus*和*Actinomyces naeslundii*是早已证实的关键致龋菌<sup>[41]</sup>。此外,有研究报道认为*Actinomyces spp.*和*Streptococcus spp.*一起参与对牙釉质的第一阶段黏附作用,对龋病的发生起重要作用。由于*Actinomyces spp.*是厌氧性细菌,在菌斑形成后优先选择寄宿到菌斑的深处缺氧层,同时在缺氧的环境下能产生乳酸,因此能作用于牙釉质产生脱矿化作用,进而慢慢腐蚀牙齿<sup>[42]</sup>。

此外,*Neisseria spp.*在3组牙菌斑样本中都大量检出,目前,*Neisseria spp.*与龋病的关系尚不很清楚,由于一些*Neisseria spp.*能产酸,其产生的多糖荚膜可以使无荚膜的细菌集聚,有研究表明*Neisseria spp.*与致龋菌*Streptococcus mutans*可相互集聚<sup>[43-44]</sup>。此外,奈瑟菌还可以促进厌氧菌的生长。因此认为*Neisseria spp.*可能普遍存在于牙菌斑中,对菌斑的形成和龋病的发生中起了一定作用。无龋组、中龋组和高龋组中还有*Veillonella spp.*和*Lactobacilla spp.*检出。研究表明,*Veillonella spp.*的数量和*Streptococcus spp.*数量有着非常密切的联系,*Veillonella spp.*中的一些种,比如*Veillonella alcalescens*可以与*Streptococcus mutans*相互促进,加速龋病的形成<sup>[45-46]</sup>。*Lactobacilla spp.*和*Streptococcus spp.*同属于厌氧产酸菌,被认为是引起龋病的主要细菌,在先前一些研究中发现大量*Lactobacilla spp.*和*Streptococcus spp.*存在于龋病中<sup>[47]</sup>。

此外,本实验采用实时定量PCR考察不同龋敏感儿童牙菌斑样本内*Streptococcus mutans*占总菌的相对数量,可知高龋组中*Streptococcus mutans*占总菌的数量最高,其次为中龋组,无龋组中*Streptococcus mutans*的数量最少。变异链球菌做为龋病的主要致病菌,其致龋机制已基本明确<sup>[48-49]</sup>,其存在数量已成为龋齿活跃性评估以及疾病状态检测的指标<sup>[50-58]</sup>。梁景平等<sup>[14]</sup>利用实时定量PCR对牙菌斑中*Streptococcus mutans*进行定量检测,发现*Streptococcus mutans*在高龋组中占总菌的比例高于无龋组( $P < 0.01$ ),

说明实时定量PCR可作为一种有效的细菌定量检测手段应用于致龋菌的定量分析过程。

**作者贡献:** 陈琳进行实验设计, 实验实施为刘莉霞, 实验评估为陈琳, 资料收集为刘莉霞, 陈琳成文, 刘莉霞审校, 刘莉霞对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 儿童监护人对实验知情同意。

**学术术语:** 龋病-是一种由牙菌斑内包括致龋菌在内的多种细菌共同作用而导致的慢性感染性疾病。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 王瑾,程为庄.玻璃离子水门汀的研究进展[J].北京生物医学工程, 2005,24(2):139-143.
- [2] Forsten L.Resin-modified glass-ionomer cements fluoride release and uptake. Acta Odonto Scand.1995;53:222-225.
- [3] Aas JA,Paster BJ,Stokes LN,et al.Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.J Clin Microbiol. 2005;43(11): 5721-5732.
- [4] Marsh PD,Bradshaw DJ.Physiological approaches to the control of oral biofilms. Adv Dent Res.1997;11(1):176-185.
- [5] Beighton D.The complex oral microflora of high risk individuals and groups and its role in the caries process. Community Dent Oral Epidemiol. 2005;33(4):248-255.
- [6] Pennisi E.A mouthful of microbes. Science. 2005;307(5717): 1899-1901.
- [7] Li J,Helmerhorst EJ,Leone CW,et al.Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm.J Appl Microbiol. 2004;97(6):1311-1318.
- [8] Cowan D,Meyer Q,Staff rd W,et al.Metagenomic gene discovery: Past, present and future.Trends Biotechnol. 2005; 23(6):321-329.
- [9] Muyzer G,Smalla K.Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 1998;73(1):127-141.
- [10] Palmer C,Bik EM,Eisen MB.Rapid quantitative profiling of complex microbial populations.Nucleic Acids Res. 2006; 34(1):e5.
- [11] World Health Organization.Oral health surveys Basic Methods. 4th ed. Geneva: World Health Organization. 1997: 1-21.
- [12] Nuebel U,Engelen B,Felske A.Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. J Bacteriol.1996;178:5636-5643.
- [13] 刘靖,王韦玮,胡凡,等.荧光原位杂交观察口腔原位菌斑中链球菌和具核梭杆菌的动态变化的研究[J].口腔医学, 2012,32(1): 15-18.
- [14] 梁景平,姜云涛,李超伦,等.实时PCR技术在龋敏感儿童牙菌斑致龋菌定量检测中的应用[J].上海交通大学学报:医学版, 2007, 27(2):128-132.
- [15] Ledder RG,Gilbert P,Pluen A,et al.Individual microflora beget unique oral microcosms.J Clin Microbiol.2006;1123-1131.
- [16] Ruby J,Goldner M.Nature of symbiosis in oral disease.J Dent Res.2007;(1):8.
- [17] McBain AJ,Bartolo RG,Catrenich CE,et al.Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms.J Appl Microbiol.2003;94:655-664.
- [18] Fujimoto C,Maeda H,Kokeguchi S,et al.Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque. J Periodont Res.2003;38:440-445.
- [19] Rudney JD,Pan Y,Chen R.Streptococcal diversity in oral biofilms with respect to salivary function.Arch Oral Biol. 2003; 48:475-493.
- [20] Rasiah IA,Wong L,Anderson SA,et al.Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time,between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. Arch Oral Biol.2005;50:779-787.
- [21] Li Y,Saxena D,Barnes VM,et al.Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota.Oral Microbiol Immunol. 2006;21:333-339.
- [22] Li Y,Ku CYS,Xu J,et al.Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis.J Dent Res.2005;84(6):559-564.
- [23] 姜云涛,梁景平,李超伦,等.不同龋敏感儿童牙菌斑内口腔链球菌的PCR-DGGE分析[J].上海交通大学学报:医学版, 2007,27(2): 133-136.
- [24] Li Y,Ismail AI,Ge Y,et al.Similarity of bacterial populations in saliva from African-American mother-child dyads.J Clin Microbiol.2007;45(9):3082-3085.
- [25] Rocas IN,Siqueira JF,Aboim MCR et al.Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral.2004;98(6):741-749.
- [26] Siqueira JF,Rocas IN,Rosado AS.Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach.Oral Microbiol Immunol. 2004;19:363-370.
- [27] Machado de Oliveira JC,Siqueira JF,Rocas IN,et al.Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis.Oral Microbiol Immunol. 2007;22: 14-18.
- [28] Paster BJ,Boches SK,Galvin JL,et al.Bacterial diversity in human subgingival plaque.J Bacteriol. 2001;183(12): 3770-3783.
- [29] Zijngje V,Harmsen HJM,Kleinfelder JW,et al.Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients.Oral Microbiol Immunol.2003;18:59-65.
- [30] Ledder RG,Gilbert P,Huws SA,et al.Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease.Appl Environ Microb.2007;73(2):516-523.
- [31] 于淼,仪虹,孟玲娜,等.不同龋状况母子间口腔微生物群落结构分析[J].口腔医学研究,2010,26(3):387-390.
- [32] Loesche WJ.The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease.Dent Update. 1992;19:68-74.
- [33] Marsh PD.Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease.Adv Dent Res. 1994;8: 263-271.

- [34] Li Y, Ge Y, Saxena D, et al. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):81-87.
- [35] 刘怡然, 王伟健, 沈家平, 等. PCR-DGGE 检测早期儿童龋治疗前后口腔菌群多样性的初步研究[J]. *口腔生物医学*, 2012, 3(4): 201-204.
- [36] Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest.* 2003; 7(4):181-188.
- [37] Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6): 456-462.
- [38] Chalmers N, Palmer Jr RJ, Cisar JO, et al. Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol.* 2008;190(24): 8145-8154.
- [39] Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19(2): 141-147.
- [40] Kreth J, Merritt J, Shi W, et al. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7193-7203.
- [41] Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-1417.
- [42] Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, et al. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiol.* 2009; 155(Pt 7):2116-2126.
- [43] Ruby JD, Shirey RE, Gerencser VF. Extracellular iodophilic polysaccharide synthesized by *Neisseria* in human dental plaque. *J Dent Res.* 1982;61(5):627-631.
- [44] Willcox MD, Drucker DB, Hillier VF. Cohesion between oral streptococci and *Neisseria pharyngis* on saliva-coated glass, in the presence and absence of sucrose. *Microbiol.* 1990; 61(248-249):197-205.
- [45] Eglund PG, Palmer RJ, Kolenbrander PE. Interspecies communication in *Streptococci gordonii* - *Veillonella* atypical biofilms: Signaling in flow conditions requires juxtaposition. *Proc N Acad Sci.* 2004;101(48):16917-16922.
- [46] Arif N, Sheehy EC, Do T, et al. Diversity of *Veillonella* spp. from sound and carious sites in children. *J Dent Res.* 2008;87(3): 278-282.
- [47] Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2):843-849.
- [48] Koga T, Oho T, Shimazaki Y, et al. Immunization against dental caries. *Vaccine.* 2002;20(16):2027-2044.
- [49] Kuramitsu HK. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. *Curr Issues Mol Biol.* 2001;3(2):35-36.
- [50] Aguilera Galaviz LA, Aceves Medina Mdel C, Estrada Garcia IC. Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus mutans* using the polymerase chain reaction. *J Clin Pediatr Dent.* 2002;27(1):47-51.
- [51] Durán-Contreras GL, Torre-Martínez HH, de la Rosa EI, et al. spaP gene of *Streptococcus mutans* in dental plaque and its relationship with early childhood caries. *Eur J Paediatr Dent.* 2011;12(4):220-224.
- [52] Acevedo AM, Ray MV, Socorro M, et al. Frequency and distribution of *Mutans Streptococci* in dental plaque from caries-free and caries-affected Venezuelan children. *Acta Odontol Latinoam.* 2009;22(1):15-20.
- [53] Kishi M, Abe A, Kishi K, et al. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of *mutans streptococci* in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009;37(3):241-249.
- [54] Okada M, Soda Y, Hayashi F, et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *J Med Microbiol.* 2002;51(5):443-447.
- [55] Franco e Franco TC, Amoroso P, Marin JM, et al. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Braz Dent J.* 2007;18(4):329-333.
- [56] Zhi QH, Lin HC, Zhang R, et al. Arbitrarily primed-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque of children with high dmft and no caries. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2007;42(4): 219-222.
- [57] Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Invest.* 2011;15(4):461-469.
- [58] Loyola-Rodríguez JP, Martínez-Martínez RE, Flores-Ferreira BI, et al. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *J Clin Pediatr Dent.* 2008;32(2): 121-126.