

# 基于real-time PCR的齿垢密螺旋体含量与慢性牙周炎严重程度的关系研究

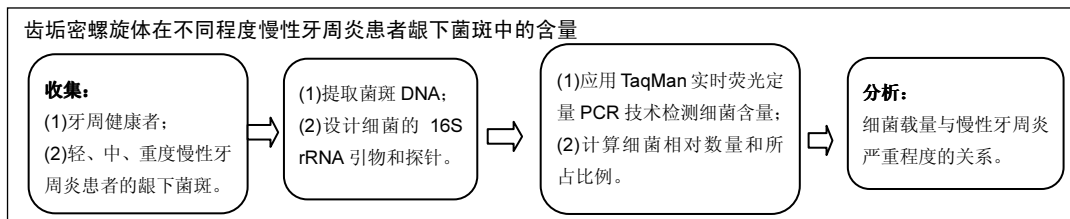
张雪梅<sup>1</sup>, 刘培培<sup>2</sup>, 刘军<sup>3</sup>, 张保荣<sup>4</sup> (<sup>1</sup>潍坊医学院口腔医学院, 山东省潍坊市 261053; 中国医科大学航空总医院, <sup>2</sup>检验科, <sup>4</sup>口腔科, 北京市 100012; <sup>3</sup>中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京市 102206)

引用本文: 张雪梅, 刘培培, 刘军, 张保荣. 基于real-time PCR的齿垢密螺旋体含量与慢性牙周炎严重程度的关系研究[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(28):4493-4498.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.28.011

ORCID: 0000-0002-5994-0713(张雪梅)

文章快速阅读:



张雪梅, 女, 1990年生, 山东省莱州市人, 汉族, 2017年潍坊医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事牙周基础研究。

通讯作者: 张保荣, 博士, 主任医师, 中国医科大学航空总医院口腔科, 北京市 100012

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)28-04493-06

稿件接受: 2017-06-03

文题释义:

**密螺旋体:** 密螺旋体属为革兰阴性厌氧菌, 形态上有时不呈螺旋状, 而呈扁平波浪形, 能自主运动, 多呈旋转运动, 在人类口腔中(包括牙周炎和牙龈炎)、牛蹄炎中都有被发现。口腔常驻菌丛之一, 主要存在于菌斑的外表面, 与龈沟和袋上皮接触, 可入侵牙周组织, 在一定条件下具有致病性, 如齿垢密螺旋体, 文氏密螺旋体等。

**慢性牙周炎:** 牙周炎是由牙菌斑中的微生物所引起的慢性感染性疾病, 由长期存在的慢性牙龈炎向深部牙周组织发展, 导致牙周支持组织的炎症和破坏, 如牙周袋形成、进行性附着丧失和牙槽骨吸收, 最后可导致牙松动和被拔出。是国内成年人牙齿丧失的首位原因, 约占牙周炎患者的 95%。

摘要

**背景:** 口腔密螺旋体与慢性牙周炎的发生发展密切相关。其中齿垢密螺旋体被认为是中等证据的致病菌, 常在牙周炎患者龈下菌斑中检出, 但在牙周健康人群中也能检测到, 其致病性可能与在牙周的定植数量有关。

**目的:** 探讨齿垢密螺旋体与慢性牙周炎不同发展阶段以及相应的牙周临床指标的关系。

**方法:** 选择 2015 年 7 月至 2016 年 8 月在航空总医院口腔科收治的 132 例慢性牙周炎患者和 40 例牙周健康者, 按照临床检查资料评估, 将慢性牙周炎患者分为轻度组( $n=41$ )、中度组( $n=46$ )和重度组( $n=45$ )。收集所有患者的龈下菌斑, 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术, 检测龈下菌斑中齿垢密螺旋体的检出率、相对检出量和所占比例。

**结果与结论:** ①齿垢密螺旋体在健康人(100%)和慢性牙周炎患者(100%)之间检出率差异无显著意义; ②慢性牙周炎组齿垢密螺旋体的相对数量及所占比例均显著高于健康组( $P < 0.000 1$ ), 轻、中和重度慢性牙周炎组之间两两比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); ③齿垢密螺旋体检出量和所占比例与牙周探诊深度呈显著正相关( $P < 0.000 1$ ), 当探诊深度  $\geq 7$  mm 时, 齿垢密螺旋体检出量明显升高( $P < 0.05$ ), 齿垢密螺旋体所占比例也显著升高( $P < 0.01$ ); ④结果表明, 齿垢密螺旋体在健康人和慢性牙周炎患者的龈下菌斑中普遍存在。龈下菌斑中齿垢密螺旋体定植水平和所占比例与牙周炎严重程度、牙周探诊深度密切相关。定植数量越高, 所占比例越多, 则患者罹患牙周炎越严重。实时荧光定量 PCR 对牙周病病因、诊断及治疗研究具有应用前景。

**关键词:**

组织构建; 组织工程; 齿垢密螺旋体; 实时荧光定量 PCR; TaqMan 系统; 探诊深度; 相对定量; 细菌载量; 龈下菌斑; 牙周病; 慢性牙周炎; 国家自然科学基金

**主题词:**

慢性牙周炎; 密螺旋体属; 聚合酶链反应; 组织工程

**基金资助:**

国家自然科学基金项目(81373141)

Zhang Xue-mei, Master, Physician, School of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Corresponding author: Zhang Bao-rong, M.D., Chief physician, Department of Stomatology, Aviation General Hospital of Chinese Medical University, Beijing 100012, China

## Real-time PCR quantification of *Treponema denticola* in subgingival plaque from patients with different severities of chronic periodontitis

Zhang Xue-mei<sup>1</sup>, Liu Pei-pei<sup>2</sup>, Liu Jun<sup>3</sup>, Zhang Bao-rong<sup>4</sup> (<sup>1</sup>School of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Clinical Laboratory, <sup>4</sup>Department of Stomatology, Aviation General Hospital of Chinese Medical University, Beijing 100012, China; <sup>3</sup>National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Oral treponemes (especially *Treponema denticola*) are widely considered to play important roles in the occurrence and development of chronic periodontitis. *Treponema denticola* can be detected in both periodontal patients and healthy individuals, so its pathogenicity may depend on its relative numbers in subgingival plaque.

**OBJECTIVE:** To detect the number of *Treponema denticola* in subgingival plaque of patients with different severities of chronic periodontitis and to investigate the relationship between the bacterial colonization and the periodontal status.

**METHODS:** Subgingival plaque samples were respectively taken from 132 patients with chronic periodontitis and 40 healthy controls, admitted in the Department of Stomatology, Aviation General Hospital of Chinese Medical University from July 2015 to August 2016. Based on the clinical data, 132 patients were divided into mild ( $n=41$ ), moderate ( $n=46$ ), and severe ( $n=45$ ) groups. The presence, relative numbers and proportion of *Treponema denticola* in the samples were detected by TaqMan real-time PCR assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There was no difference in the presence of *Treponema denticola* in subgingival plaque between healthy and periodontal participants. The relative numbers and proportion of *Treponema denticola* in the periodontal patients were significantly higher than those in the healthy controls ( $P < 0.000 1$ ). The quantification of *Treponema denticola* in different stages of periodontitis did show significant differences ( $P < 0.05$ ). In addition, the bacterial level and proportion of *Treponema denticola* were positively correlated to the probing depths ( $P < 0.000 1$ ). When the probing depth was more than 7 mm, the bacterial level and proportion of *Treponema denticola* were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). These findings suggest that *Treponema denticola* widely exists in subgingival plaque of human. The bacterial load and proportion of *Treponema denticola* are tightly related to the severity of periodontitis and probing depth. The higher bacterial level and proportion of *Treponema denticola* indicate a severer periodontitis. Moreover, real-time PCR possesses a broad potential in the studies on etiology, diagnosis and treatment of periodontology.

**Subject headings:** Chronic Periodontitis; Treponema; Polymerase Chain Reaction; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81373141

**Cite this article:** Zhang XM, Liu PP, Liu J, Zhang BR. Real-time PCR quantification of *Treponema denticola* in subgingival plaque from patients with different severities of chronic periodontitis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(28):4493-4498.

## 0 引言 Introduction

牙周病是由牙菌斑生物膜引起的牙周组织的感染性疾病,能够造成牙齿支持组织的炎性破坏——牙周袋形成和炎症、进行性的附着丧失和牙槽骨吸收,最终可导致牙齿的松动甚至脱落。中国第三次口腔流行病学调查显示人群中35岁以上牙周病患病率高达85%–86%,40%以上的中老年人群均能检测出牙周袋,牙周炎已经成为国内成年人牙齿缺失的首位原因<sup>[1]</sup>。牙周炎分为慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、反应全身疾病的牙周炎等多种类型。其中,慢性牙周炎是最常见的一类牙周炎,约占牙周炎患者的95%<sup>[2]</sup>。目前牙周病被认为是多因素疾病,菌斑微生物作为始动因子,在引发牙周组织损伤过程中具有重要作用<sup>[3]</sup>。

牙龈卟啉单胞菌、福赛坦氏菌和齿垢密螺旋体被认为是龈下菌斑中主要的可疑致病菌,与慢性牙周炎关系密切<sup>[4]</sup>,其中齿垢密螺旋体被认为是中等证据的牙周致病菌<sup>[5]</sup>。齿垢密螺旋体是一种螺旋形的革兰阴性厌氧菌,属解糖密螺旋体,是口腔内常见的密螺旋体,其具有多种毒力因子,如类糜蛋白酶等,可致牙槽骨吸收、体内细胞因子释放紊乱、抗体产生等一系列炎症免疫反应<sup>[6-8]</sup>。齿垢密螺旋体常在牙周炎患者龈下菌斑中检出,在牙周健康人群中也能检测到<sup>[9-11]</sup>。牙周炎非特异性菌斑学说表明:只有当致病微生物数量到达某个临界值时才会引起牙周组织不可逆损害<sup>[12]</sup>,由此推测,其致病性可能与其在牙周的定植数量有关。目前关于齿垢密螺旋体在慢性牙周炎龈下菌斑中的绝对定量或半定量检测也有过报道,但由于采样方法的不同或者不精确,导致研究结果无法进行比较。

由于齿垢密螺旋体的分离培养极为困难,需要利用其

他研究手段加以研究。实时荧光定量PCR常用来检测临床样本中的病原微生物,具有实时检测、灵敏度高、特异性强、无需电泳、快速、可定量等优点<sup>[13]</sup>。因此实验使用TaqMan实时荧光定量PCR技术来检测慢性牙周炎患者龈下菌斑中的菌群及齿垢密螺旋体的16SrRNA,计算齿垢密螺旋体的检出率、相对检出量和在牙菌斑菌群中的占比,分析细菌负荷与不同牙周状况的关系,进一步探讨齿垢密螺旋体在牙周炎发生发展过程中的作用。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 分组对照分子学实验。

1.2 时间及地点 于2015年7月至2016年10月在中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所完成。

1.3 对象 随机抽取航空总医院口腔科牙周健康患者40例,其中男性19例,女性21例,年龄22–69岁。牙周健康患者纳入标准:①全口余留牙不少于20颗;②全口牙周探诊深度 $\leq 3$  mm;③无临床附着丧失,无明显牙龈红肿或退缩,口腔内无黏膜病损。

选取2015年7月至2016年8月在航空总医院牙周科初诊为慢性牙周炎(根据Armitage1999年新分类诊断<sup>[14]</sup>)患者132例,其中男性67例,女性65例,年龄25–73岁。根据临床检查资料评估<sup>[15]</sup>,将132例慢性牙周炎患者分为轻度组( $n=41$ )、中度组( $n=46$ )和重度组( $n=45$ )。①轻度:牙龈有炎症和探诊出血,牙周袋3 mm<探诊深度 $\leq 4$  mm,附着丧失1.0–2.0 mm,X射线片显示牙槽骨吸收不超过根长的1/3;②中度:牙龈有炎症和探诊出血,牙周袋4 mm<探诊深度 $\leq 6$  mm,附着丧失3.0–4.0 mm,X射线片显示牙槽

骨水平型或角型吸收超过根长的1/3, 但不超过根长的1/2, 牙齿可能有轻度松动, 多根牙有轻度根分叉病变; ③重度: 牙龈炎症比较明显, 或发生牙周脓肿, 牙周袋>6 mm, 附着丧失≥5.0 mm, X射线片显示牙槽骨吸收超过根长1/2, 牙齿松动, 多根牙有根分叉病变。

所有受试者3个月内未进行过龈下刮治或者根面平整术、无抗生素服用史; 全身无系统性疾病。受试者均签署知情同意书。采样流程和标准由航空总医院牙周科所有老师共同参与制定。

#### 1.4 方法

**1.4.1 临床指标的检测及龈下菌斑样本的采集** 记录受试者性别、年龄、临床诊断情况以及受检牙位。由牙周专科医生检测并记录各位点的探诊深度、附着丧失等临床指标。选取牙周健康者四个象限第一磨牙颊侧近中位点(健康位点)和慢性牙周炎患者口内磨牙牙周袋最深位点(病变位点)取样。用龈上洁治器轻轻去除龈上菌斑后, 无菌棉球隔湿, 干燥, 消毒牙面, 无菌刮匙深入袋底, 尽量不接触牙面, 到达袋底遇到阻力后, 用相当的力量刮取菌斑, 动作轻柔, 置于含有500 μL Hank's液的无菌EP管中, 置-80 °C冰箱冻存备用。

**1.4.2 DNA提取** 应用血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化有限公司)进行龈下菌斑DNA的提取与纯化, 提取方法参照试剂盒操作手册。NanoDrop2000检测提取的DNA浓度, 分装, 置-20 °C保存备用。

**1.4.3 TaqMan实时荧光定量PCR** 研究所用的特异性引物和探针根据细菌16S rRNA基因特异保守区域设计, 同时应用NCBI中的Primer-BLAST程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对引物特异性进行验证。见表1(由Invitrogen(上海)贸易有限公司合成)。

表1 实时荧光定量 PCR 引物及探针

Table 1 Primers and probes for real-time PCR

引物和探针	序列(5'→3')	产物大小(bp)
通用 <sup>[16]</sup>		86
上游引物	CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG	
下游引物	GCT TGA CGG GCG GTG T	
探针	FAM-TAC AAG GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG-BHQ	
齿垢密螺旋体 <sup>[17]</sup>		120
上游引物	CCG AAT GTG CTC ATT TAC ATAAAG GT	
下游引物	GAT ACC CAT CGT TGC CTT GGT	
探针	FAM-ATG GGC CCG CGT CCC ATT AGC-BHQ	

将齿垢密螺旋体和真细菌的PCR产物作为目的DNA片段, 分别构建含有齿垢密螺旋体和真细菌靶基因的重组质粒, 将质粒标准品连续10倍梯度稀释至浓度 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/μL, 建立定量标准曲线:

$$Y(\text{copy}/\mu\text{L}) = \{X(\text{g}/\mu\text{L})\text{DNA}/(\text{DNA长度}(\text{bp}) \times 660)\} \times 6.02 \times 10^{23} \quad [18]$$

实时荧光定量PCR的定量检测: 反应体系为20 μL,

Premix Ex Taq(Probe qPCR)(TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司)10 μL, PCR上下游引物各0.2 μmol/L, TaqMan Probe 0.4 μmol/L, ROX Reference Dye II(50×)终浓度1×, DNA模板4 μL, ddH<sub>2</sub>O(灭菌蒸馏水)4.2 μL。反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 进行40个循环。所有反应在ABI 7500 Fast荧光定量PCR仪上(Applied Biosystems, 美国)进行。

**1.4.4 质量控制** 每个标准品和样本均重复检测3次, 取其平均值。每次反应均设空白对照、阴性对照和标准品阳性对照。这里选择大肠杆菌DH5α(中国疾病预防控制中心病毒预防控制所提供)作为阴性对照。同时, 对实时荧光定量PCR产物进行测序(美吉测序)。

计算齿垢密螺旋体相对检出量公式:  $\text{COPY}/\text{ng} = (\text{COPY}/\mu\text{L})/\text{DNA浓度} \quad [19]$

计算齿垢密螺旋体所占比例公式:  $P = 1/N$ ;

$$N = 2^{\Delta\text{Ct}} = 2^{(\text{Ct T. denticola} - \text{Ct 16S rRNA})}$$

N即指齿垢密螺旋体拷贝数相对于总细菌拷贝数的倍数差异<sup>[20]</sup>。

Ct值的含义: 即Cycle threshold, 是指在荧光定量PCR过程中, 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

**1.5 主要观察指标** ①齿垢密螺旋体的检出率; ②齿垢密螺旋体的检出量和所占比例; ③齿垢密螺旋体的检出量和所占比例与牙周探诊深度的关系。

**1.6 统计学分析** 运用SPSS 20.0进行数据处理。 $\chi^2$ 比较健康组与轻、中、重度慢性牙周炎组之间齿垢密螺旋体检出率有无差异; 采用Kruskal-Wallis检验比较各组间细菌负荷的差异; 应用Mann-Whitney U检验比较每两组之间的差异; 利用Spearman相关性分析方法分析细菌负荷与探针长度的关系。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 一般临床资料比较** 纳入研究的慢性牙周炎患者和健康人之间的年龄和性别比较无统计学差异。慢性牙周炎轻、中、重3组探诊深度和临床附着丧失均明显大于健康组, 且轻、中、重度慢性牙周炎组两两比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表2。

表2 各组患者的基本资料

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=172$ )

Table 2 Clinical characteristics of the patients in each group

临床参数	健康组 ( $n=40$ )	慢性牙周炎组		
		轻度组 ( $n=41$ )	中度组 ( $n=46$ )	重度组 ( $n=45$ )
年龄(岁)	43.27±11.75	41.76±12.63	47.27±12.90	46.89±12.46
性别(男%)	47.50	43.90	52.17	55.56
探诊深度(mm)	2.00±0.00	3.80±0.70	5.60±0.40	7.60±1.40
附着丧失(mm)	0	1.50±0.70	4.00±0.00	5.50±0.50

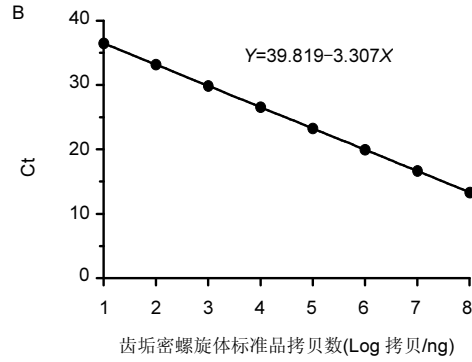
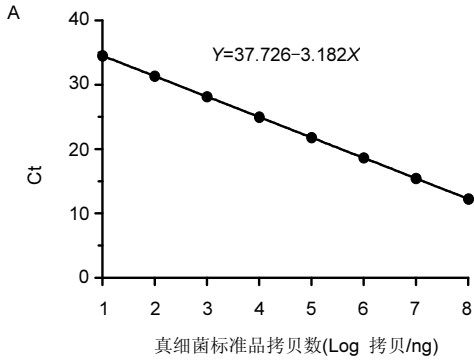


图1 总细菌和齿垢密螺旋体实时荧光定量PCR标准曲线  
Figure1 Standard curve of the total bacterial and *Treponema denticola* detected by real-time PCR assay  
图注: 图中A为总细菌的实时荧光定量PCR标准曲线; B为齿垢密螺旋体的实时荧光定量PCR标准曲线; Ct值是指在荧光定量PCR过程中, 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

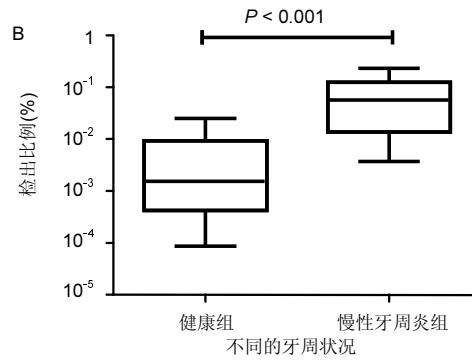
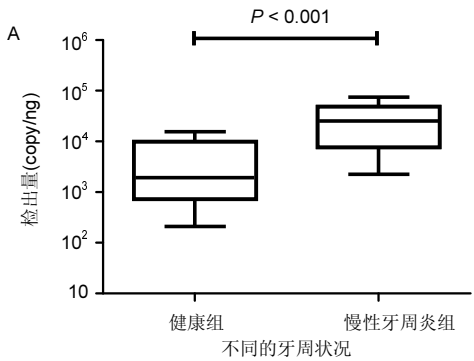


图2 齿垢密螺旋体在健康组和慢性牙周炎组中相对数量和比例分布  
Figure 2 Distribution of the relative numbers and proportion of *Treponema denticola* in different periodontal status  
图注: 图A为齿垢密螺旋体的相对数量变化, B为齿垢密螺旋体的比例分布。

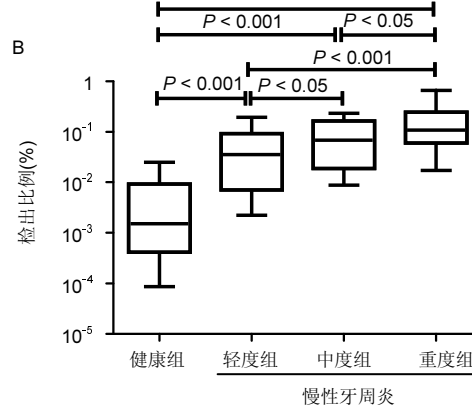
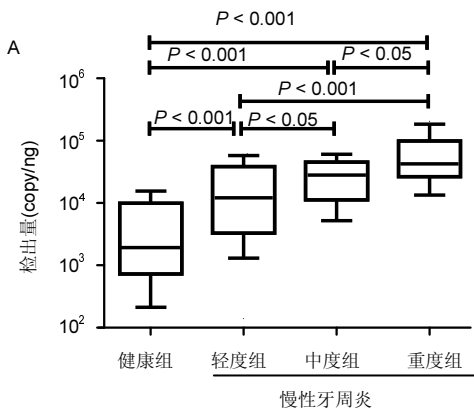


图3 齿垢密螺旋体在不同严重程度的牙周炎患者牙菌斑菌群中相对数量和比例分布  
Figure 3 Distribution of the relative numbers and proportion of *Treponema denticola* in different stages of periodontitis  
图注: 图A为齿垢密螺旋体的相对数量变化, B为齿垢密螺旋体的比例分布。

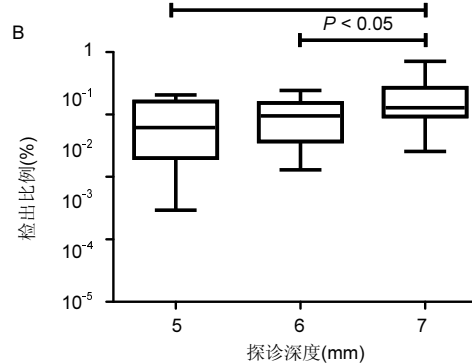
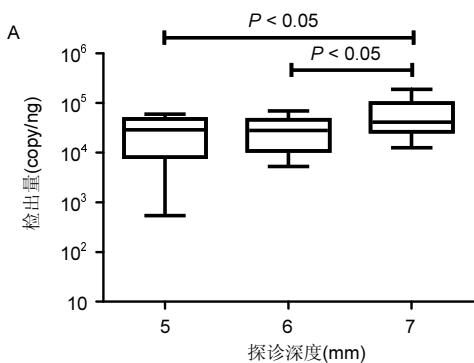


图4 齿垢密螺旋体在不同探诊深度组的牙菌斑菌群中的相对数量和比例分布  
Figure 4 Distribution of the relative numbers and proportion of *Treponema denticola* with different probing depths  
图注: 图A为齿垢密螺旋体的相对数量变化, B为齿垢密螺旋体的比例分布。

2.2 细菌实时荧光定量PCR的特异性与灵敏度 应用NCBI中的Primer-BLAST程序分析引物, 结果显示这对引物对齿垢密螺旋体16S rRNA序列模板是特异的; 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 稀释后用齿垢密螺旋体的引物和探针进行检测, 未见扩增; 实时荧光定量PCR扩增后, 对PCR产物进行测序, 序列经NCBI的BLAST程序分析, 表明产物就是齿垢密螺旋

体的基因组片段(序列同源性高达99%以上); 利用通用引物和对应探针检测大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和所有样本, 均为阳性。将齿垢密螺旋体和真细菌重组质粒进行10倍梯度稀释, 可最低检出10拷贝/ $\mu$ L; 质粒DNA浓度在 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu$ L范围内, 质粒DNA浓度的对数值与Ct值具有良好的线性关系( $R^2=0.998$ )。

**2.3 齿垢密螺旋体和总细菌的定量检测** 将齿垢密螺旋体和真细菌的重组质粒DNA连续10倍梯度稀释后, 进行实时荧光定量PCR所获得的标准曲线见图1。根据标准曲线对样本中的齿垢密螺旋体和总细菌进行定量。

**2.4 健康组与慢性牙周炎组齿垢密螺旋体检出率、相对检出量和所占比例的比较** 齿垢密螺旋体在健康组(100%)和慢性牙周炎组(100%)间的检出率无差异。健康组与慢性牙周炎组中齿垢密螺旋体相对数量和所占比例见图2, 慢性牙周炎组齿垢密螺旋体的检出量、所占比例均显著高于健康组( $P < 0.000 1$ )。健康组与轻、中和重度慢性牙周炎组齿垢密螺旋体检出量和所占比例见图3, 4组间任意两组差异显著( $P < 0.000 1$ ); 轻、中和重度组的齿垢密螺旋体检出量和所占比例均高于健康组( $P < 0.000 1$ ); 中度组高于轻度组( $P < 0.05$ ), 但低于重度组( $P < 0.05$ )。

**2.5 齿垢密螺旋体细菌载量与探针深度的关系** 齿垢密螺旋体检出量和所占比例与性别、年龄无显著相关性, 但与探诊深度呈显著正相关性(所占比例 $r=0.63$ ,  $P < 0.000 1$ ; 检出量 $r=0.57$ ,  $P < 0.000 1$ )。按照探针长度数值即5 mm、6 mm、 $\geq 7$  mm进行分组, 各组齿垢密螺旋体检出量和所占比例见图4。采用Kruskal-Wallis检验进行统计分析, 结果表明3组间齿垢密螺旋体检出量和所占比例差异显著( $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ )。同时应用Mann-Whitney  $U$ 检验进行两两比较, 5 mm组与6 mm组的齿垢密螺旋体检出量和所占比例差异均无显著性意义( $P=0.91$ 和 $P=0.22$ )。当探诊深度 $\geq 7$  mm时, 齿垢密螺旋体检出量明显升高( $P < 0.05$ ), 齿垢密螺旋体所占比例也显著升高( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论 Discussion

牙周病是一类由多种致病微生物引发的感染性疾病。在多种致病微生物中, 口腔螺旋体与牙周感染密切相关, 其在健康牙周组织中检出量极低, 但在急性坏死性溃疡性龈炎和慢性牙周炎中, 数量可达到检出微生物总量的50%以上<sup>[21]</sup>。

研究采用TaqMan实时荧光定量PCR方法, 对132例慢性牙周炎患者和40例健康人龈下菌斑中齿垢密螺旋体进行定量检测, 样本全部为阳性(100%), 提示齿垢密螺旋体广泛存在于健康人和牙周炎患者的龈下菌斑中。关于牙周可疑致病菌是否为牙周常驻菌的争论一直存在, 其在牙周健康者和牙周炎患者中的检出率也不尽相同。周婷等<sup>[22]</sup>通过PCR方法检测健康人和慢性牙周炎患者龈下菌斑中的齿垢密螺旋体, 发现慢性牙周炎中重度患者的检出率明显高于健康人的检出率。Abiko等<sup>[23]</sup>采用TaqMan实时荧光定量PCR方法发现齿垢密螺旋体在牙周炎患者和健康人龈下菌斑中的检出率分别为86.5%、15.4%。朱丽芳等<sup>[15]</sup>通过TaqMan实时荧光定量PCR方法发现慢性牙周炎组齿垢密螺旋体检出率和健康组差异无统计学意义。不同研究结果产生的原因推测可能与取样方法、标本处理、检测方法(如标准品设置)、研究对象不一致等因素有关。

与牙周致病菌的检出率相比, 检出量或特定致病菌在龈下菌斑中所占的比例与慢性牙周炎严重程度及发展预后关系更为密切。Socransky等<sup>[12]</sup>提出, 口腔中牙周致病菌的存在不一定引起牙周组织破坏, 牙周致病菌的量要超过宿主的阈值才可能导致牙周炎症的发生和发展。Mineoka等<sup>[24]</sup>通过实时荧光定量PCR方法发现, 探诊深度 $\geq 4$  mm且诊断后出血阳性位点的齿垢密螺旋体检出量和所占比例明显多于探诊深度 $< 4$  mm或诊断后出血阴性的位点。研究应用实时荧光定量PCR检测发现随着炎症严重程度增加, 齿垢密螺旋体的检出量、所占比例均不断增加, 提示齿垢密螺旋体的增加可能是导致牙周炎症的发生并促进炎症发展的病因。另外研究还发现, 虽然齿垢密螺旋体在各组间检出率没有差异, 但其检出量和所占比例在各组间的差异均有统计学意义, 提示相对于阳性检出率而言, 齿垢密螺旋体检出量或检出比例的增加对牙周病因学的研究更有意义。

目前牙周病的诊断主要依靠最基本的临床检查, 而传统的诊断通常用的是物理学评价方法, 不能完全反映出疾病的内涵变化。这就需要做进一步的检查, 以确定疾病的性质。为此, 研究对齿垢密螺旋体相对检出量、检出比例与探诊深度进行相关性分析, 发现齿垢密螺旋体检出量、所占比例均与探诊深度存在正相关( $r=0.57$ 和 $r=0.63$ ), 表明随着探针深度的增加, 齿垢密螺旋体检出量和所占总细菌的比例均增加, 进一步说明齿垢密螺旋体含量的变化可以反映牙周炎的严重程度。该结果与ELISA检测法和暗视野显微镜计数法一致<sup>[23-24]</sup>。研究又进一步将探针深度分为5 mm、6 mm、 $\geq 7$  mm三个组别, 发现探诊深度为5, 6 mm时, 齿垢密螺旋体检出量和检出比例差异均无统计学意义, 当牙周探诊深度 $\geq 7$  mm时, 齿垢密螺旋体相对数量和所占比例均有显著增高。这一结果表明, 当牙周袋到达一定深度时, 齿垢密螺旋体的数量可能到达了促进疾病发展的阈值水平。因此, 传统的临床检查参数结合微生物学检查, 对于揭示牙周病的本质, 优化治疗计划、评价疗效和在维护期的监测等具有重要意义。

龈下菌斑的定量取样方法应用较为广泛的主要有两种: 标准纸尖法和刮匙刮取法。尽管标准纸尖法操作简单、重复性较好, 但其采集的菌斑量少, 无法达到袋底, 未到袋底就吸收龈沟液而达到饱和, 容易造成样本的假阴性<sup>[25]</sup>。而刮匙刮取法可到达牙周袋底部, 采集袋底深部的菌斑生物膜, 并且采集菌斑量大<sup>[26-27]</sup>, 但其重复性差, 不能进行绝对定量。现有的取样技术使龈下菌斑取样难以做到绝对的标准, 因此Lyons等<sup>[28]</sup>认为混合菌斑中某一细菌的相对数量比绝对数量更重要。研究采用无菌刮治器刮取龈下菌斑法, 检测混合菌斑中齿垢密螺旋体的相对数量和菌群中所占的比例, 显著提高了样本的检出率、有效性、全面性。

综上所述, 齿垢密螺旋体在慢性牙周炎患者龈下菌斑中有较高的检出量和检出比例, 且随着牙周炎破坏程度增加而增加。齿垢密螺旋体的定植水平可作为观察牙周炎严

重程度或监测治疗效果的一项指标。TaqMan实时荧光定量PCR用于检测牙周致病菌, 特异性和灵敏度都很高, 所以应用此技术结合牙周病临床参数, 可更深入了解牙周病, 更利于牙周病的预防和早期诊断。

**作者贡献:** 张雪梅、张保荣进行实验设计, 实验实施为张雪梅, 实验评估为刘军、刘培培, 资料收集为张雪梅, 张雪梅成文, 张保荣、刘培培审核。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 研究用人体组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] 齐小秋.第三次全国口腔健康流行病学调查报告[M].人民卫生出版社,2008:128.
- [2] Shaddox LM, Walker CB.Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions.Clin Cosmet Investig Dent. 2010;2:79-91.
- [3] Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, et al. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. BMC Oral Health. 2015;15:33.
- [4] Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology. 2005;38(1):135-187.
- [5] Kasuga Y, Ishihara K, Okuda K. Significance of detection of Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and Treponema denticola in periodontal pockets. Bull Tokyo Dent Coil. 2000;41(3):109-117.
- [6] Ellen RP, Galimanas VB. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. Periodontol 2000. 2005;38:13-32.
- [7] Visser MB, Ellen RP. New insights into the emerging role of oral spirochaetes in periodontal disease. Clin Microbiol Infect. 2011;17(4):502-512.
- [8] Lee SF, Andrian E, Rowland E, et al. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of Treponema denticola infection. Infect Immun. 2009;77(2):694-698.
- [9] Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, et al. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. Oral Microbiol Immunol. 2000;15(3):196-202.
- [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, Sakamoto M, et al. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol.2001;72(10):1354-1363.
- [12] Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol.1992;63(4Suppl):322-331.
- [13] Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. J Clin Periodontol. 2006;33(6):427-433.
- [14] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Northwest Dent. 2000; (6):31-35.
- [15] 朱丽芳,郑瑜谦,闫福华.不同牙周状况龈下菌斑中齿垢密螺旋体的分布[J].口腔医学研究, 2010,26(1):67-70.
- [16] Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, et al. Quantitation of Bacteroides forsythus in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. J Microbiol Methods. 2000;39(2):97-107.
- [17] Rodrigues AS, Lourencao DS, Lima Neto LG, et al. Clinical and microbiologic evaluation, by real-time polymerase chain reaction, of non-surgical treatment of aggressive periodontitis associated with amoxicillin and metronidazole. J Periodontol. 2012;83(6):744-752.
- [18] Reis LC, Rocas IN, Siqueira JF, et al. Bacteremia after endodontic procedures in patients with heart disease: culture and molecular analyses. J Endod. 2016;42(8):1181-1185.
- [19] Asai Y, Jinno T, Igarashi H, et al. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3334-3340.
- [20] Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, et al. Development of a 5' Nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens streptococcus mutans and streptococcus sobrinus. J Clin Microbiol. 2003; 41(9):4438-4441.
- [21] Chan EC, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. J Oral Microbiol. 2000;15(1):1-9.
- [22] 周婷,谢红,岳朝晖.种牙周龈下可疑致病微生物与慢性牙周炎局部不同牙周状态间关系[J].华西口腔医学杂志,2013,31(5):518-521.
- [23] Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, et al. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. J Periodontol Res. 2010;45(3):389-395.
- [24] Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in subgingival plaque. J Periodontol. 2008;79(4):670-676.
- [25] Baker PJ, Butler R, Wikesjo UM. Bacterial sampling by absorbent paper points: an in vitro study. J Periodontol.1991;62(2):142-146.
- [26] Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, et al. Comparison of various detection methods for periodontopathobacteria: can culture be considered the primary reference standard. J Clin Microbiol.1992;30(2):418-426.
- [27] Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of Eubacterium nodatum and Treponema denticola with human periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 2006; 21(5): 269-282.
- [28] Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2362-2365.