

16S rDNA 多重 PCR 检测牙周组织感染菌及混合感染与慢性牙周炎病变程度关系的研究

占定凤 刘志伟 夏肖萍 胡建成 陈莉丽 严杰

【摘要】 目的 建立多重 16S rDNA PCR 检测慢性牙周炎(CP)标本中牙龈卟啉单胞菌(Pg)、伴放线杆菌(Aa)和齿垢密螺旋体(Td),了解不同感染情况与 CP 严重程度的关系。方法 将轻、中和重度 152 例 CP 患者牙周袋标本和 30 名牙周健康者龈沟标本置于 200 μ l 裂解缓冲液中,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后取 10 μ l 上清液作为聚合酶链反应(PCR)模板。常规酚-氯仿法提取的 Pg ATCC33277 株、Aa Y4 株、Td FM 株和 *E. coli* DH5 α 株 DNA 分别作为 PCR 阳性和阴性对照。采用 Pg、Aa 和 Td 16S rDNA 特异性引物,建立多重 PCR 检测上述标本。3 例 Pg、Aa 和 Td PCR 结果均阳性标本的目的扩增片段 T-A 克隆后测序。采用 χ^2 检验分析不同混合感染情况与牙周炎严重程度之间的关系。结果 所建立的多重 16S rDNA PCR 最低可检出 10 个 Pg、20 个 Aa 和 20 个 Td 细胞。Pg、Aa 和 Td 16S rDNA 扩增片段与已报道的序列比较,相似性分别高达 99.45%、97.08% 和 96.59%。30 名牙周健康者龈沟标本中,仅有 1 名 Pg(3.3%)、2 名 Aa(6.7%) 的 16S rDNA 扩增结果阳性,其余标本均阴性。152 例 CP 患者牙周袋标本中,147 例(96.7%) 检出 Pg、Aa 和/或 Td 的 16S rDNA,5 例(3.3%) 扩增结果均阴性。Pg 的 PCR 检测阳性率(91.5%, 139/152) 明显高于 Aa(72.4%, 110/152) 或 Td(80.9%, 123/152)($\chi^2 = 7.07, 18.67; P < 0.01$)。89.8% 的患者标本有上述 2 种(26.5%) 或 3 种细菌(63.3%) 同时感染,且中、重度牙周炎混合感染率明显高于轻度牙周炎($\chi^2 = 10.43, P < 0.01$)。结论 所建立的多重 16S rDNA PCR 有较高的敏感性和特异性,可同时检测临床标本 Pg、Aa 和 Td。CP 是一种多种病原菌混合感染性疾病,病原菌协同致病作用与 CP 严重程度有因果关系。

【关键词】 牙周炎,慢性; 牙龈卟啉单胞菌; 放线杆菌; 齿垢密螺旋体; 16S rDNA 基因

Study on the detection of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* and the correlation between coinfections of the microbes and levels of chronic periodontitis lesion ZHAN Ding-feng*, LIU Zhi-wei, XIA Xiao-ping, HU Jian-cheng, CHEN Li-li, YAN Jie.* Department of Clinical Laboratory, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

Corresponding author: YAN Jie, Email: yanchen@mail.hz.zj.cn

【Abstract】 Objective To establish a 16S rDNA multiplex polymerase chain reaction(PCR) for simultaneously detecting *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* in clinical specimens of chronic periodontitis and to study the correlation between different modes of infection and severity of the disease. **Methods** Periodontal pocket specimens from 152 patients with mild, moderate or advanced chronic periodontitis and gingival sulcus specimens from 30 periodontally healthy individuals were collected and placed in 200 μ l lysis buffer. The specimens were incubated in 100 $^{\circ}$ C for 10 min and 10 μ l of the supernatant was directly used as PCR template. DNAs from *P. gingivalis* strain ATCC33277, *A. actinomycetemcomitans* strain Y4, *T. denticola* strain FM and *E. coli* strain DH5 α were used as positive and negative controls in PCR with all of which were prepared by routing phenol-chloroform method. A multiplex PCR assay, using three sets of primers specific to 16S rDNA genes of the three anaerobes, was developed to detect the specimens. The target amplification fragments from 3 cases of PCR

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(N29953)

作者单位:310016 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科(占定凤、刘志伟、夏肖萍、胡建成);浙江大学医学院附属第二医院口腔科(陈莉丽);浙江大学医学院病原生物学教研室(严杰)

通讯作者:严杰, Email: yanchen@mail.hz.zj.cn

products positive for all the three anaerobes were sequenced after T-A cloning. Chi-square test was applied to analyze the correlation between different coinfection of the three anaerobes and severity of the disease.

Results The established 16S rDNA multiplex PCR assay was able to detect *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* at a minimum of 10, 20 and 20 cells, respectively. In comparison with the reported corresponding sequences, similarities of the nucleotide sequences from the three anaerobes 16S rDNA amplification fragments were as high as 99.45%, 97.08% and 96.59%, respectively. Of the 30 periodontally healthy gingival sulcus specimens, only one (3.3%) positive for *P. gingivalis* and two (6.7%) for *A. actinomycetemcomitans* could be identified but all of the rest were negative. In the 152 CP periodontal pocket specimens, 147 cases (96.7%) were positive for *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and/or *T. denticola*, respectively, and 5 cases (3.3%) were negative for all the three anaerobes. The positive rate of *P. gingivalis* detection (91.5%, 139/152) was significantly higher than those of *A. actinomycetemcomitans* (72.4%, 110/152) and *T. denticola* (80.9%, 123/152) ($\chi^2 = 7.07, 18.67; P < 0.01$). 89.8% of the specimens from patients showed coinfections with two (26.5%) or three anaerobes (63.3%), and the coinfection rates in the specimens from moderate and advanced CP were remarkably higher than that from mild CP ($\chi^2 = 10.43, P < 0.01$). **Conclusion** The 16S rDNA multiplex PCR established in this study showed high sensitivity and specificity, which could be used to detect *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* in clinical specimens. CP was an disease caused by multiple pathogenic microbes while the synergistic pathopoiesis of the three microbes was closely related to the severity of the disease.

【Key words】 Periodontitis, chronic; *Porphyromonas gingivalis*; *Actinobacillus*; *Treponema denticola*; 16S rDNA genes

牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) 和伴放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa) 分别被认为是慢性牙周炎 (CP) 和侵袭性牙周炎 (AP) 特异的致病菌^[1, 2], 齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*, Td) 感染与牙周组织破坏密切相关^[3]。以往我们研究发现 33.3% 的 AP 标本中可检出 Pg, 26.5% CP 标本可分离出 Aa^[4]; 此后国外文献也报告 Pg 确实可成为晚期 AP 牙周袋中优势菌^[5]。上述病原菌均为专性厌氧菌, 难培养且阳性率低^[6]。国外已将聚合酶链反应 (PCR) 作为牙周炎病原菌临床常规诊断方法, 但所用方法只能检测单种细菌^[7, 8]。我们拟建立能同时检测 Pg、Aa 和 Td 的多重 16S rDNA PCR, 分析不同混合感染情况与 CP 严重程度关系, 以期获得上述病原菌协同致病的流行病学证据。

对象与方法

1. 病例来源及分类: 152 例初诊患者均来自浙江大学医学院各附属医院, 其中男性 67 例, 女性 85 例, 年龄 25~67 岁, 平均 40.5 岁。按 Hugoson 介绍的方法将上述病例分为轻、中和重度三类^[9], 分别为 32、77 和 43 例。另采集 30 名牙周健康的常规体检者龈沟标本作为对照, 其中男性 13 名, 女性 17 名, 年龄 22~59 岁, 平均 36.3 岁。所有受试者就诊前至少 30 天内未服用任何抗生素。

2. 牙周袋及龈沟标本的采集: 采用纸签法从患者牙周袋内最深处处、牙周健康者牙龈沟内分别采

集标本, 置 200 μ l 裂解缓冲液 (1.0 mmol/L EDTA、1.0% Triton X-100、10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中, PCR 检测前暂存于 -20 $^{\circ}$ C。

3. 参考标准菌株: Pg ATCC33277 和 Aa Y4 及 Td FM 株、大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α 株均由浙江大学医学院病原生物学教研室提供。

4. 模板 DNA 的制备: 上述临床标本 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 取 10 μ l 上清液直接作为 PCR 的模板。采用常规酚-氯仿法提取 Pg ATCC33277、Aa Y4、Td FM 和 *E. coli* DH5 α 的 DNA, 紫外分光光度法测定其浓度和纯度^[10], 分别用于 PCR 灵敏度检测及阳性和阴性对照。

5. PCR 引物的选择: 采用 Pg、Aa 和 Td 种特异性 16S rDNA 引物^[7, 8]。Pg 引物序列: 上游 5'-AGG CAGCTTGCCATACTGCG-3', 下游 5'-ACTGTT AGCAACTACCGATGT-3'。Aa 引物序列: 上游 5'-ATGCCAAATTGACGTTAAAT-3', 下游 5'-AAA CCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'。Td 引物序列: 上游 5'-TAATACCGAATGTGCTCATTTCAT-3', 下游 5'-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3'。引物由上海 BioAsia 公司合成。

6. PCR 和扩增产物检测: 采用大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 的 PCR 试剂。PCR 总体积 100 μ l, 内含: 0.25 mmol/L 各 dNTP、2.5 mmol/L MgCl₂、250 nmol/L 各引物、3.0 U EX-Taq 酶、10 μ l 模板、1 \times PCR 缓冲液 (pH 8.4); 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 3 min \times 1; 94 $^{\circ}$ C 1 min、54 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1.5 min \times

35;72 ℃ 7 min×1。实验中分别以 100 ng 的 Pg ATCC33277 株、Aa Y4 株和 Td 031010 株的 DNA 为阳性对照,100 ng 的 *E. coli* DH5α 的 DNA 为阴性对照,等体积水代替模板为空白对照。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,Pg、Aa 和 Td 16S rDNA 预期目的扩增片段长度分别为 404、557 和 316 bp。

7. PCR 的敏感性:将已知 CFU/ml 值 Pg ATCC33277、Aa Y4 和 Td FM 培养物的离心沉淀物重悬于 200 μl 裂解缓冲液中,100℃ 水浴 10 min,上清液连续稀释后取 10 μl 作为模板,PCR 条件及产物检测方法同上。

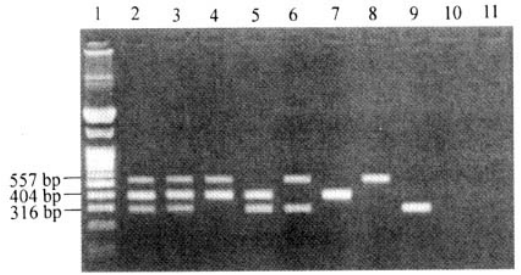
8. T-A 克隆及测序:采用上海 BBST 公司 PCR 产物回收/纯化试剂盒和 T-A 克隆试剂盒,将 3 例 Pg、Aa 和 Td PCR 均阳性标本的目的扩增片段回收、纯化并克隆至 pUCm-T 质粒中,重组质粒经转化、蓝白筛选、扩增后用碱变性法提取质粒,用内切酶 Pst I (TaKaRa) 初步鉴定后,委托 BioAsia 公司测序^[10]。

9. 资料分析:目的扩增片段测序结果与 GeneBank 中相应序列比较 (Pg: L16492, Aa: M75036, Td: AE017226)。采用 SPSS 9.0 软件及 χ^2 检验分析 Pg、Aa 和 Td 混合感染与牙周炎严重程度之间的关系。

结 果

1. 多重 PCR 的敏感性:所建立的多重 16S rDNA PCR 最低可检出相当于 10 个 Pg、20 个 Aa 和 20 个 Td 的 DNA。

2. PCR 检测结果及其分布:30 例牙周健康者龈沟标本中,1 例 (3.3%)Pg、2 例 (6.7%)Aa 的 16S rDNA 扩增结果阳性,其余均为阴性。在 152 例 CP 患者牙周袋标本中,147 例 (96.7%) 检出 Pg、Aa 和/或 Td 的 16S rDNA,5 例 (3.3%) 标本扩增结果均阴性。其中 Pg 的 PCR 检测阳性率 (91.5%, 139/152) 明显高于 Aa (72.4%, 110/152) 和 Td (80.9%, 123/152) ($\chi^2 = 7.07, 18.67; P < 0.01$), 但 Aa 和 Td 阳性率之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.11, P > 0.05$)。147 例 PCR 阳性标本中,三种病原菌混合感染率 (63.3%, 93/147) 明显高于两种病原菌 (26.5%, 39/147) ($\chi^2 = 40.09, P < 0.01$), 两种病原菌混合感染率又明显高于单一病原菌 (10.2%, 15/147) ($\chi^2 = 13.07, P < 0.01$)。PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱及检出细菌的分布分别见图 1 和表 1。



1:100 bp DNA Marker; 2:100 ng Pg ATCC33277、Aa Y4 和 Td FM 株 DNA 的阳性对照; 3:Pg、Aa 和 Td 均阳性的标本; 4:Pg 和 Aa 阳性、Td 阴性的标本; 5:Pg 和 Td 阳性、Aa 阴性的标本; 6:Aa 和 Td 阳性、Pg 阴性的标本; 7~9:仅 Pg、Aa 或 Td 阳性的标本; 10、11:分别为阴性对照和空白对照

图1 Pg、Aa 和 Td 16S rDNA 多重 PCR 检测结果的琼脂糖凝胶电泳图谱

表1 152 例 CP 患者牙周袋和 30 例牙周健康者龈沟标本 PCR 检测结果的分布

16S rDNA			牙周袋标本	龈沟标本
Pg	Aa	Td		
+	+	+	93	0
+	+	-	15	1
+	-	+	22	0
-	+	+	2	0
+	-	-	9	0
-	+	-	0	1
-	-	+	6	0
-	-	-	5	28
合计			152	30

+ : 阳性; - : 阴性

3. 核苷酸序列分析:3 份标本 Pg、Aa 和 Td 16S rDNA 扩增片段与 GeneBank 中相应序列 (L16492、M75036 和 AE017226) 的相似性分别为 99.45%、97.08% 和 96.59%。

4. 不同混合感染情况与 CP 严重程度的关系:中度以上 CP 标本中均可检出 1~3 种上述病原菌,所有 5 例阴性标本均来自轻度 CP 患者 (表 2)。重度 CP 标本中均可检出 Td,并包含了所有 6 份单一 Td 阳性的标本;中度 CP 标本中 Td 检出率 (97.4%, 75/77) 也明显高于轻度 (18.5%, 5/27) ($\chi^2 = 70.08, P < 0.01$)。中度 CP 标本 Pg 和 Aa 检出率 (98.7%, 85.7%) 均明显高于轻度 (84.4%, 59.4%)、重度 (83.7%, 58.1%) ($\chi^2 = 8.92 \sim 11.15, P < 0.01$), 但轻、重度 CP 标本之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.01, 0.07, P > 0.05$)。中度以上 CP 标本两种或两种以上微生物的感染率 (94.2%, 113/120) 明显高于轻度标本 (59.4%, 19/32) ($\chi^2 = 10.43, P < 0.01$)。

表2 轻、中和重度牙周炎患者标本中 Pg、Aa 和/或 Td 不同感染情况的分布

病情程度	病例数	感染例数分布						
		Pg/Aa/Td	Pg/Aa	Pg/Td	Aa/Td	Pg	Td	阴性
轻度	32	5	14	0	0	8	0	5
中度	77	64	1	10	1	1	0	0
重度	43	24	0	12	1	0	6	0
合计	152	93	15	22	2	9	6	5

注:未检出单一 Aa 阳性的标本

讨 论

通常在临床标本中细菌达到较高数量时,才能用培养法分离到相应菌株,厌氧菌因大气氧的抑制甚至杀灭作用,其分离培养更为困难^[11]。多数口腔厌氧菌往往培养3~7天才能出现菌落;Pg、Aa 和 Td 还需分别使用专用选择培养基 KVB、PYS 和 TSBV 才能获得较高的阳性率^[12]。因此,本文建立的多重 16S rDNA PCR 同时检测牙周炎病灶中的 Pg、Aa 和 Td 有其重要的现实意义。

考虑到快速诊断在临床上的重要性,我们采用临床标本 100℃ 水浴后的上清液作为 PCR 的模板。多重 16S rDNA PCR 检测结果表明,该方法可有效地同时检测上述三种牙周主要病原菌,其敏感性高达 10 个 Pg、20 个 Aa 和 20 个 Td 细胞。核苷酸序列分析结果表明,多重 16S rDNA PCR 扩增的目的片段与 GeneBank 中相应 Pg、Aa 和 Td 序列比较,相似性分别高达 99.45%、97.08% 和 96.59%,表明该方法用于检测牙周袋标本中 Pg、Aa 和 Td 的结果可靠。因此,本文所建立的多重 16S rDNA PCR 可用于检测牙周炎临床,甚至亚临床水平的感染^[11,12]。

在 152 例 CP 患者牙周袋标本中, Pg 阳性率 (96.7%) 明显高于 Aa (72.4%) 和 Td (80.9%) ($P < 0.01$), 表明 Pg 仍然是 CP 最主要的牙周炎病原菌。在 147 例各种 PCR 阳性标本中, 绝大多数 (89.8%) 有上述两种 (26.5%) 或三种微生物 (63.3%) 同时感染, 且中、重度牙周炎混合感染率明显高于轻度牙周炎 ($\chi^2 = 10.43, P < 0.01$), 证实 CP 确是一种多种病原菌引起的感染性疾病, 并提示多种牙周病原菌协同致病作用与 CP 严重程度有因果关系。令人感兴趣的是, 一般认为 Aa 是 AP 特异的病原菌^[1,4], 但我们的实验结果却发现该菌在 CP 标本中的阳性率也高达 72.4%, 但无一例为该菌单一感染, 且有 Aa 随 CP 病情加剧而逐渐被 Td 所替代的现象, 提示 CP

早期时 Aa 有可能作为兼性厌氧菌在建立局部厌氧微环境发挥作用, 从而有利于 Pg 和 Td 的生长和繁殖。Td 属于对氧极度敏感的厌氧菌。本实验中轻度 CP 标本无一例 Td 检测结果阳性, 所有 6 例单一 Td 感染阳性标本均在重度 CP 标本中, 这可能与较深牙周袋易形成低氧化还原电位有关。因此, 若想获得较高的 Td 阳性检测率, 应选择中度或重度牙周袋最深处的标本。

参 考 文 献

- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, et al. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. J Clin Periodontol, 1997, 24:767-776.
- Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, et al. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. J Periodontal Res, 2001, 36:114-123.
- Murro CD, Paolantonio M, Pedrazzoli V, et al. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by ELISA technique. J Periodontol, 1997, 68:18-23.
- 严杰, 陈莉莉, 朱仲珍, 等. 牙周炎患者龈下厌氧菌群的分离和鉴定. 浙江医科大学学报, 1993, 22:122-124.
- Mombelli A, Gmur R, Gobbi C, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. J Periodontol, 1994, 65:892-893.
- Kigure T, Saito A, Seida K, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. J Periodontal Res, 1995, 30:332-341.
- 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. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11:266-273.
- Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, et al. Detection of putative pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis, 1995, 20 suppl 2:304-307.
- Hugoson A, Jordan T. Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease. Community Dent Oral Epidemiol, 1982, 10:187-192.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol, 1997, 14:12-32.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol, 2001, 183:3770-3783.

(收稿日期:2004-03-11)

(本文编辑:尹廉)