

# 托槽对上切牙菌斑中变形链球菌影响的定量研究

艾虹<sup>1</sup>, 卢红飞<sup>1</sup>, 梁焕友<sup>1</sup>, 席云<sup>1</sup>, 黄旭芬<sup>1</sup>, 胡斌<sup>2</sup>

(中山大学 1. 附属第三医院口腔科, 广东 广州 510630; 2. 达安基因诊断中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】对粘结托槽前后菌斑中变形链球菌数量的差异进行定量研究。【方法】采用自身对照法。每个患者分两阶段取样: 粘结托槽前和粘结托槽后 4 周; 取样牙位包括上 4 个切牙。设计针对变链菌的特异性引物和 MGB 探针, 应用实时荧光定量 PCR 技术测定每毫克菌斑样本中变链菌的数量。【结果】同一患者粘结托槽前后变链菌数值分别为  $5.31 \times 10^6$  /mg 和  $6.35 \times 10^6$  /mg, 其差别有统计学意义 ( $P=0.0025$ )。【结论】患者粘结托槽后, 菌斑中变链菌密度的明显升高, 可能是正畸治疗中白垩斑发生率较高的原因之一。

**关键词:** 变形链球菌; 牙釉质脱矿; 托槽; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R783.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0101-03

## Effects of Brackets on Mutans Streptococcus in Plaque Between Maxillary Incisors: A Quantity Study

AI Hong<sup>1</sup>, LU Hong-fei<sup>1</sup>, LIANG Huan-you<sup>1</sup>, XI Yun<sup>1</sup>, HUANG Xu-fen<sup>1</sup>, HU Bin<sup>2</sup>

(1. Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, 2. Da an Genetic Diagnostical Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objectives】To compare the amount of mutans streptococcus in plaque before and after the fixed appliance bonding. 【Methods】The present study was designed as a randomized paired study. Plaque samples were taken from the surface around the bracket of four maxillary incisors before and after the fixed appliances bonding for four weeks. The amount of MS per mg of plaque was measured by real time fluorescence-quantitative PCR. 【Results】The counts of mutans streptococcus in plaque before and after the fixed appliance bonding were  $5.31 \times 10^6$  /mg and  $6.35 \times 10^6$  /mg respectively, and the increase has statistical significance ( $P=0.0025$ ). 【Conclusions】The significant increase of the density of mutans streptococcus during orthodontic treatment maybe the etiology agent for enamel demineralization.

**Key words:** mutans streptococcus; enamel demineralization; brackets; real time fluorescence-quantitative PCR

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006,27(1):101-103]

据国外统计资料报道, 正畸病人釉质脱矿的发病率约为 50%<sup>[1]</sup>, 而国内的发病率约为 59.4%, 在被观察的牙齿中的发病率为 12.5%<sup>[2]</sup>。因此, 釉质脱矿成为正畸治疗过程中有待解决的问题。有研究认为变形链球菌 (以下简称变链菌, Mutans Streptococcus) 与龋病的发生密切相关, 是主要的致龋菌<sup>[3]</sup>。目前评价患者龋活性的常用指标之一是测定唾液中的变链菌浓度<sup>[4-6]</sup>, 但唾液的各参数, 如流速、流量以及 pH 值等都较不稳定, 容易导致实

验结果产生误差。因此, 本实验采用先进的实时荧光定量 PCR 技术, 以牙面菌斑中变链菌的密度作为测量指标, 比较同一患者在粘结托槽前后, 变链菌在菌斑中的数量是否存在明显差异, 能更客观地反映出正畸对患者的致龋危险性。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例选择

收稿日期: 2005-06-21

基金项目: 广东省科技计划基金资助项目 (2004B30901008)

作者简介: 艾虹 (1964-), 女, 湖南湘潭人, 副主任医师, 硕士生导师; 卢红飞, 通讯作者, E-mail: lhf\_dr@163.com

选择 2003 年 5 月至 2003 年 7 月间初诊病例 10 例, 其中男 4 例, 女 6 例, 年龄为 15~18 岁。入选标准: 拟粘结托槽的牙齿无牙周病、白垩斑、龋齿及充填体; 有良好的口腔卫生习惯, 每天早、午、晚使用含氟牙膏刷牙 3 次; 正畸治疗前两周无抗生素使用史; 无全身系统性疾病。

## 1.2 主要材料

3M MBT 直丝弓托槽, 测试期内采用镍钛圆丝和不锈钢结扎丝; 粘结剂: 3M Transbond™ XT 光凝粘结剂。

## 1.3 实验方法

采用自身前后对照法。粘结托槽前为对照组, 粘结托槽四周后为实验组, 每组各 40 颗牙齿。实验前对患者进行常规口腔卫生宣教并测定菌斑指数<sup>[7]</sup>。研究期间不服用任何抗生素。取样前检查并确定取样区无龋并测定菌斑指数, 实验组的菌斑指数必须与对照组相同或相差 1, 否则改日再取。分别在粘结托槽前和粘结托槽后第 4 周对患者的四个上切牙进行取样。取样时间均为上午 9~10 点进行, 患者晨起后常规刷牙, 不吃早餐。取样范围在粘结托槽前以取样牙位的唇侧临床冠中心为中点, 刮取 6 mm×6 mm 范围内的牙菌斑, 在粘结托槽后刮取托槽(面积约 4 mm×4 mm)四周 2 mm 以内的牙菌斑保存于 EP 管内, 置于-20℃冰箱中待用。以置入菌斑前后 EP 管的质量差为菌斑质量(精确至 0.01 mg)。

## 1.4 检测方法

1.4.1 设计引物和探针 根据变链菌基因中的 16S rRNA 上部分序列为目标, 设计针对变链菌的特异性引物和 MGB(minor groove binder)探针, 引物和探针的设计采用软件 Primer-Express 2.0。变链菌目标序列如下: CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC CG (全长 62 bp, NCBI 上序列号 SMU243965)。引物序列如下: F: 5'-CGGTGG AGCATGTGGTTTAAAT-3'; R: 5'-CGGGATGTCAA GACCTGGTAAG-3'。MGB 探针序列如下: 5'-FAM-AAGCAACGCGAAGAA-MGB-3'。引物和探针非修饰部分的分子: 上游: 6 342 bp; 下游: 6 711 bp; 探针: 4 868 bp。经 Blast 同源性比较  $P > 99\%$ 。

1.4.2 变链菌的荧光定量 PCR 测定 先制作纯变链菌样本, 然后制作变链菌荧光定量阳性标准品梯度和制作变链菌荧光定量阴性质控标准品:

用灭菌双蒸水作为阴性对照。对样本进行以下处理: 将所取菌斑样本用 100  $\mu\text{L}$  PBS 清洗, 以 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。沉淀中加入 500  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水, 清洗后以 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀中加入 50  $\mu\text{L}$  碱性裂解液(含 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS, 3 mol NaCl), 加样后充分混匀, 置于 100℃沸水浴中处理 10 min, 以 12 000 r/min 离心 15 min。取 5  $\mu\text{L}$  上清作荧光定量 PCR 分析模板。然后对样本进行荧光定量 PCR 测定: 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ : 5×定量 PCR buffer (美国 ABI 公司试剂盒) 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物 F (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 下游引物 R (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , 荧光探针 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (2 U/ $\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ , 模板 5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 29.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 93℃ 2 min, 然后 93℃ 1 min, 55℃ 1 min, 共 40 个循环, 使用荧光定量仪 ABI7000 全自动荧光定量 PCR 仪。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。

## 1.5 统计学处理

采用 The SAS system 统计软件, 自身前后对照分析采用配对 t 检验, 检验水准为双侧  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

标准阳性模板产生的标准曲线回归方程的相关系数  $r$  达到 0.9965, 表明本实验的实时荧光定量结果准确可靠; 所有样本的实时荧光定量 PCR 扩增曲线线性关系良好。同一患者粘托槽前后变链菌的平均绝对拷贝数值分别为  $5.31 \times 10^6$  /mg 和  $6.35 \times 10^6$  /mg, 其差别有显著性意义 ( $P = 0.0025$ )。说明粘托槽之后, 患者牙菌斑中变链菌密度增高。

## 3 讨 论

### 3.1 托槽对变链菌的影响

一般地, 在不同个体相同部位的健康牙面上菌斑的细菌成分基本相同, 但从早期釉质平滑面龋(白垩斑)采集的菌斑标本中, 变链菌的比例明显高于邻近健康牙面, 提示变链菌的比例与釉质脱矿有正相关关系<sup>[3]</sup>。测定唾液中的变链菌浓度是目前评价患者龋活性的常用指标之一<sup>[4-6]</sup>, 但唾液的各参数, 如流速、流量以及 pH 值等都较不稳定, 受饮食等方面的影响较大, 而参数的不同则会导

致实验结果产生误差。因此, 本实验选取牙面菌斑中变链菌的密度作为测量指标, 能更客观地反映出患者的致龋危险性。

有关实验表明正畸儿童唾液内变链菌的数目明显高于正常儿童, 而正畸儿童与正常儿童的唾液缓冲能力以及细菌的产酸能力在统计学上无显著性差异<sup>[4]</sup>。与变链菌有关的实验大都是选用细菌培养及菌落计数的检测方法, 不但在临床取样时极易受到污染, 检测的周期较长, 而且变链菌是一种兼性厌氧菌, 在有氧的情况下容易死亡进而影响菌落的生成, 造成较大的实验误差, 因此对本标的输送时间、条件要求很高。本实验采用的实时荧光定量 PCR 技术, 不需细菌培养, 因此变链菌的存活与否并不重要。这种技术能实时检测 PCR 复制开始时变链菌的 DNA 拷贝数, 不但结果的精确程度大大提高, 而且检测的周期较短。本实验结果表明两者间差异有统计学意义 ( $P=0.0025$ ), 这可能是正畸治疗中白垩斑发生率较高的原因之一, 但其前后间变链菌的数量差异要比同类实验在唾液中测得的差异要少<sup>[4,5]</sup>。我们认为可能是由于与以往的检测方法不同所致, 细菌培养法精确程度相对实时荧光定量 PCR 较低。

### 3.2 检测变链菌的分子生物学方法

在口腔微生物的研究中, 常规的检测方法包括: 细菌的分离培养, 菌落形态观察, 生化特性检验及代谢产物分析等, 不仅操作复杂, 检测周期长, 且特异性敏感性都受到很大的限制。随着分子生物学技术的发展, 聚合酶链反应 (PCR) 给口腔微生物的检测带来明显的便利, 而 PCR 技术发展到现在, 也已经很好地实现了从定性到定量的转变。本实验采用的是实时荧光定量 PCR 技术 (real time fluorogenic quantitative PCR), 是在反应体系中加入可与反应同步的荧光基团, 利用荧光信号积累, 实时检测整个反应进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析<sup>[6]</sup>。该技术克服了常规 PCR 的许多缺点, 如一般 PCR 产物都需通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶染色和紫外光观察结果或通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测, 不仅需多种仪器, 而且费时费力, 所使用的染色剂溴化乙啶对人体又有害, 这些繁杂的实验过程又给污染和假阳性提供了机会, 而荧光定量 PCR 只需在加样时打

开一次盖子, 其后的过程完全是闭管操作, 避免了常规 PCR 操作中的诸多弊端<sup>[9]</sup>。Shelburne 等<sup>[10]</sup>比较了终点 PCR、酶联免疫法及定量 PCR 在检测牙周细菌时的阳性率, 发现  $(3.7 \pm 0.6) \times 10^4$  个菌量可被酶联免疫法检出, 200 个菌量可被终点 PCR 法检出, 而 10 个左右的菌量就可被荧光定量 PCR 法检出, 说明这种荧光定量 PCR 技术具有高灵敏性、高特异性和高精确性的特点。

本实验结果显示荧光定量反应的扩增曲线稳定, 标准阳性模板产生的标准曲线回归方程的相关系数  $r=0.9965$ , 表明本实验的实时荧光定量结果准确可靠。这也说明荧光定量 PCR 技术是适用于变链菌检测的、高灵敏性、高特异性和高精确性的方法, 而且使用方便。

### 参考文献:

- [1] GORELICK L, GEIGER A M, GWINNETT A J. Incidence of white spot formation after bonding and banding[J]. Am J Orthod, 1982, 81(2):93-8.
- [2] 胡 炜, 王 勤, 傅民魁. 口腔固定矫治器应用中牙釉质脱矿的临床调查 [J]. 口腔正畸学, 2001, 8(2): 51-4.
- [3] 王翰章. 中华口腔科学(上卷)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 436-439.
- [4] 陈梅红, 李 璞, 尚 斌, 等. 正畸与正常儿童龋活性比较[J]. 口腔医学纵横杂志, 2002, 18(1): 29-30.
- [5] JORDAN C, LEBLANC D J. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci [J]. Oral Microbiol Immunol, 2002, 17(2):65-71.
- [6] 王文辉, 卞金有. 唾液及口腔卫生状况与乳牙龋齿的关系[J]. 现代口腔医学杂志, 2003, 17(1): 68-70.
- [7] 卞金有, 胡德渝. 口腔预防医学[M] 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 32.
- [8] 凌均棨, 陈 罕. 龋病病因微生物学研究和龋病分子诊断[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(1): 1-3.
- [9] 韩俊英. 荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(3): 117-8.
- [10] SHELburne C E, PRABHU A, GLEASON R M. Quantitation of Bacteroides forsythus in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction[J]. J Microbiol Methods, 2000, 39(2):97-101.

(编辑 刘清海)