

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.009

文章编号: 1005-8982(2016)02-0043-04

论著

采用 16S rRNA 基因分析技术鉴定正畸患者矫治前 龈沟液的细菌种类*

刘大佳¹, 杨明², 陈利玉², 朱飞舟³, 黄诗雨², 雷勇华¹, 魏高星², 肖润沙¹, 刘慧霞¹
(1. 中南大学湘雅医院 干部医疗科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院, 湖南 长沙 410013;
3. 中南大学 生命科学学院生物化学系, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 了解安氏Ⅱ类错颌畸形患者矫治前期龈沟液的细菌分布情况,为进一步探讨细菌感染对安氏Ⅱ类错颌畸形矫治后牙根吸收的影响奠定基础。**方法** 从中南大学口腔医学院收集 24 例安氏Ⅱ类错颌畸形的 12~18 岁患者龈沟液,在厌氧条件下进行细菌培养,PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因序列,经测序后通过序列比对鉴定细菌菌株。**结果** 共鉴定出 43 株菌,其中链球菌属 18 种菌株,奈瑟菌属 7 种菌株,放线菌属 6 种菌株,孪生球菌属 2 种菌株,罗氏菌属 2 种菌株,艾肯菌属等其他 8 个菌属各 1 种菌株。**结论** 安氏Ⅱ类错颌畸形患者矫治前期龈沟液中分布多种细菌。

关键词: 16S rRNA 基因;安氏Ⅱ类错颌畸形;龈沟液;细菌分布

中图分类号: R781.4

文献标识码: A

Identification of bacterial species in gingival crevicular fluid of malocclusion orthodontic patients before correction by 16S rRNA gene sequencing*

Da-jia Liu¹, Ming Yang², Li-yu Chen², Fei-zhou Zhu³, Shi-yu Huang²,
Yong-hua Lei¹, Gao-xing Wei², Run-sha Xiao¹, Hui-xia Liu¹

(1. Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 3. Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of bacterial flora in gingival crevicular fluid of Angle II malocclusion orthodontic patients in the early stage of correction, so as to figure out the influence of microbial infection on tooth root absorption in Angle II malocclusion orthodontic patients after correction. **Methods** The gingival crevicular fluid of 24 Angle II malocclusion orthodontic patients was collected from Xiangya Stomatological Hospital of Central South University. They were 12-18 years old. Then anaerobic cultivation was carried out. Bacterial 16S rRNA gene sequences were amplified by PCR, and then the bacteria strains were identified by sequence alignment. **Results** Forty-three strains of bacteria were identified, which included 6 strains of Actinomycetes, 18 strains of Streptococcus, 7 strains of Neisseria, 2 strains of Gemella, and 2 strains of Rothia, 1 strains of Eikenella and other 7 bacteria species. **Conclusions** There is a wide bacterial spectrum in gingival crevicular fluid of Angle II malocclusion orthodontic patients in the early stage of correction.

Keywords: 16S rRNA; Angle II malocclusion orthodontics; gingival crevicular fluid; bacterial distribution

收稿日期: 2015-08-15

* 基金项目: 国家大学生创新训练立项资助项目(No: AY12039)

[通信作者] 刘慧霞, E-mail: lhx900@aliyun.com; Tel: 13807483737

• 43 •

正畸过程中出现的牙根吸收现象近年来越来越受到医患双方的关注,已经成为正畸治疗过程中最敏感的话题之一。至今为止,牙根吸收的确切原因仍未明确,微生物感染可能是导致牙根吸收的重要原因。

鉴定病原细菌有多种方法,如形态学观察、血清分型、生化分析、遗传学分析等。遗传学分析法有基因序列分析、分子标记检测、核酸分子杂交等^[1]。16S rRNA 基因在基因序列分析中应用最多。16S rRNA 基因长约 1.5 kb,其序列保守性高于酶基因,因为 rRNA 具有独特性和重要性等特点,结构特殊并保守,所以对影响其结构的突变具有抵抗性^[2]。但是,16S rRNA 基因具有“种”间多态区,所以分析其序列可确定各种细菌的进化距离和相互关系,并鉴定细菌^[3-4]。而且,16S rRNA 基因在细菌中普遍存在,适用于所有细菌的分析。

本研究以最容易发生牙根吸收以及牙根吸收程度最大的安氏 II 类错殆畸形患者为研究对象,采用 16S rRNA 基因序列分析法检测安氏 II 类错殆正畸患者矫治前期龈沟液细菌分布情况,为进一步探讨安氏 II 类错殆畸形矫治与牙根吸收的关系及细菌感染对牙根吸收的影响奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样本材料

24 例安氏 II 类错殆畸形患者,年龄(12~18 岁)龈沟液液标本(病例样本来自中南大学口腔医学院)。

1.2 方 法

1.2.1 标本处理 用无菌拭纸条在患者矫治前采集畸形牙部位龈沟液,即刻将蘸有龈沟液的无菌拭纸条插入到无菌硫乙醇酸盐缓冲液中,5 min 内将标本用无菌的枪头混匀接种到血琼脂平板上,放入厌氧培养箱内培养(37℃,80%氮气,20%二氧化碳),培养 48 h 后,拍照记录平板上细菌生长情况。

1.2.2 提取细菌基因组 DNA 取一个无菌 200 μl EP 管,加入 20 μl 的无菌生理盐水。用无菌 10 μl 枪头小心挑取单个菌落,加入到 200 μl 的 EP 管中,充分混匀,再加入 20 μl 的丙酮,置于沸水浴中煮沸 10 min,然后 12 000 r/min 离心 2 min,其上清液即为细菌 DNA 溶液,将其作为 PCR 扩增的模板。

1.2.3 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段 细菌 DNA 溶液为模板,PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因。正向引物:27F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,反向引物:1492R:ACGGCTACCTGTTACGACTT(由北京鼎国生物技术公司合成),扩增片段长度 1 460 bp。50 μl PCR 扩增体系:模板(DNA 上清液)10 μl,2 × PCR mix 25 μl,20 μmol/L 的正向引物 1 μl,20 μmol/L 的反向引物 1 μl,无菌双蒸水 ddH₂O 13 μl。用 TC-512 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增。扩增条件如下:94℃变性 5 min 后于 94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 90 s,30 个循环后于 72℃延伸 7 min。PCR 产物置入 4℃冰箱保存备用。

1.2.4 PCR 产物序列分析 将 PCR 产物送南京金斯瑞生物技术有限公司进行测序。

1.2.5 细菌菌种鉴定 根据测序所得的细菌 16S rRNA 基因片段的序列图,去掉两端的不规则峰,取中间约 1 300 bp 片段(根据每个测序样本结果而定,主要用去掉不规则峰后的可信序列碱基进行对比)序列进行细菌菌种鉴定,将合理序列导入美国 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 blastn 在线软件,选择 Nucleotide collection(nr/nt)数据库,运行 blastn 程序,取 16S rRNA 基因序列同源性最高的细菌作为鉴定的结果。

2 结 果

2.1 细菌分离培养

将培养 48 h 后的血平板取出后,观察细菌菌落,结果见图 1 可见,选择优势菌挑选单个菌落提取 DNA。

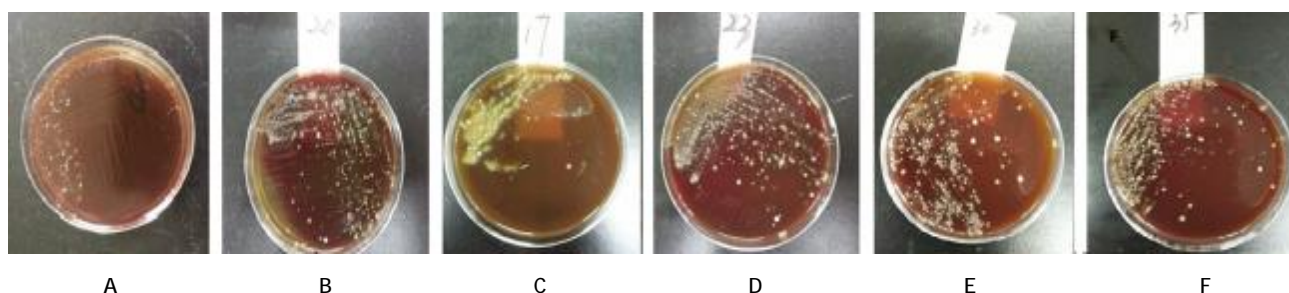
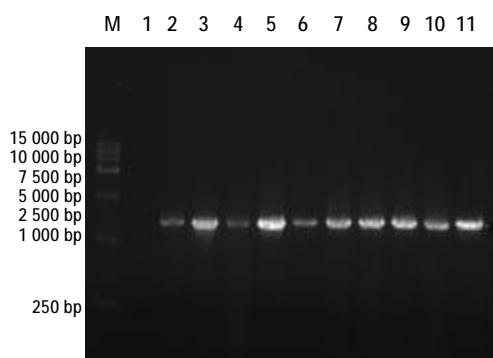


图 1 部分龈沟液标本厌氧培养后细菌菌落情况

2.2 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因片段

PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因片段,在每次进行 PCR 扩增过程中,均设置一个空白对照组,即以无菌双蒸水 ddH₂O 为模板进行质控,以保证操作的规范性,因为实验所采用的是细菌 16S rRNA 的通用引物,那么空气中及其器材上的污染菌群也能扩增出大小一样的片段,相对的严格无菌操作比较能保证实验结果的可靠性,加样的过程在超净工作台



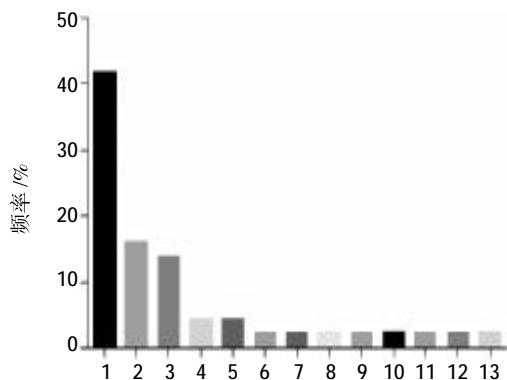
M:Marker;1:以双蒸水 ddH₂O 为模板的空白对照组;2-11:样本 PCR 片段

图 2 PCR 扩增样本细菌的 16S rRNA 基因片段

进行,PCR 扩增片段大小为 1 460 bp,见图 2。

2.3 细菌鉴定结果

应用 NCBI 中 blastn 在线软件对测序结果的碱基序列进行比对鉴定,将其符合度最高的作为最终鉴定结果,结果共鉴定出 43 株菌(见图 3 和附表),其中鉴定出链球菌属(*Streptococcus*)18 种菌株,该菌属中 *Streptococcus salivarius* 比例最高,占 19%;鉴定出奈瑟菌(*Neisseria*)7 种菌株,其中 *Neisseria macacae* 比例最高,占 38%;鉴定出放线菌(*Actino*



1:链球菌;2:奈瑟菌;3:放线菌;4:罗氏菌;5:李生球菌;6:侵蚀艾肯菌;7:嗜二氧化碳菌;8:嗜根库克菌;9:银色棒状杆菌;10:软弱乏养菌;11:纤毛菌;12:奇异口动菌;13:产气肠杆菌

图 3 16S rRNA 测序鉴定的龈沟液细菌分布情况

附表 龈沟液细菌鉴定结果

菌种	菌株	收录号
放线菌		
<i>Actinomyces</i> sp	Oral taxon 175 strain F0384	HM596281.1
<i>Actinomyces</i> sp	ChDC B197	AF543275.1
<i>Actinomyces</i> sp	C162	EF474012.1
<i>Actinomyces timonensis</i>	DSM 23838	EU484334.1
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>	AF543286.1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Strain KN165	JX524810.1
链球菌属		
<i>Streptococcus intermedius</i>	C270	CP003858.1
<i>Streptococcus salivarius</i>	LD219	AB530698.1
<i>Streptococcus</i> sp	2056B	AF316593.1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	JCM 5708	AB596946.1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	NR_024841.1
<i>Streptococcus</i> sp	DSM 27088, isolate 7747	HG315101.1
<i>Streptococcus mitis</i> bv.2	F0392	GU470907.1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	GumJ19	GU561370.1
<i>Streptococcus anginosus</i>	PG18	GU561378.1
<i>Streptococcus salivarius</i>	CCRI 17344	FJ154798.1
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 9811	GU045384.1
<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	Challis	NR_074516.1
<i>Streptococcus constellatus</i>	H39	AB749301.1
<i>Streptococcus constellatus</i>	Strain 1	AY277937.1
<i>Streptococcus</i> sp.oral	BW009	AY005042.1
<i>Streptococcus oralis</i> Uo5	Uo5	NR_102809.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ejeff	GU561401.1
<i>Streptococcus anginosus</i>	Strain1093	AF145244.1
奈瑟菌		
<i>Neisseria elongata</i> subsp. nitroreducens	CIP 103511	JN175349.1
<i>Neisseria meningitidis</i>	31015	FJ932762.1
<i>Neisseria macacae</i>	M-740	HF558383.1
<i>Neisseria</i> sp. oral	AP067	AY005024.1
<i>Neisseria oralis</i>	11-26359	JN986582.1
<i>Neisseria</i> sp. 5737a	<i>Neisseria</i> sp. 5737a	KC178551.1
<i>Neisseria</i> sp. 4363d	<i>Neisseria</i> sp. 4363d	KC178531.1
其他		
<i>Rothia</i> sp	Oral taxon 188	GU470892.1
<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	DQ409140.1
<i>Gemella sanguinis</i>	2045-94	NR_026419.1
<i>Gemella haemolysans</i>	ATCC 10379	NR_025903.1
<i>Eikenella corrodens</i>	JCM 12952	AB525415.1
<i>Capnocytophaga</i> sp	Oral taxon 336 clone X089	GU410282.1
<i>Kocuria rhizophila</i>	R-42745	FR682683.1
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	DSM 44202	CP006365.1
<i>Abiotrophia defectiva</i>	Strain 98223019	AY879308.1
<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	Strain F0264	FJ577259.2
<i>Lautropia mirabilis</i>	Strain SSI AB 2188	HF558380.1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EA1509E	FO203355.1

myces)6 种菌株,该属中 *Actinomyces* sp Oral taxon 175 strain F0384 比例最高,占 39%;孪生球菌属 2 株,即 *Gemella sanguinis* 和 *Gemella haemolysans*;罗氏菌属 2 株,即 *Rothia* sp Oral taxon 188 和 *Rothia mucilaginosa*;艾肯菌属等其他 8 个菌属各 1 种菌株。结果表明,安氏 II 类错殆畸形患者矫治前期龈沟液中分布多种细菌。

3 讨论

牙根吸收是正畸治疗过程中常见的医源性并发症之一,正常情况下,正畸治疗引起的牙根吸收是微量的,没有明显的临床症状,不会影响牙齿的正常功能和寿命。但在异常情况下,有部分患者会发生严重的牙根吸收现象,特别是上前牙牙根吸收严重,可能引起前牙过早松动脱落,影响颜面美观和正常牙殆功能,因此,为了保证正畸治疗疗效的稳定及治疗后牙齿及牙周组织的健康,必须明确正畸治疗过程中影响牙根吸收的各种因素。现阶段研究表明影响牙根吸收的因素有多方面,包括性别、营养状况^[9]、开始治疗的年龄^[6]、牙殆类型^[7]、颌面特征^[8]、减数与否^[9-10]、治疗前牙根状况、采用的治疗方法^[11]、疗程^[12-13]以及微生物感染等。

口腔内存在多种微生物,在正畸过程中它们可由牙龈进入牙根深处,生长增殖,在正畸过程中产生局部炎症,可能导致各种破骨因子,激活破骨细胞,导致牙根吸收甚至牙槽骨吸收。目前研究显示导致牙槽骨吸收的可疑细菌主要有 6 种,分别是牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、伴放线菌嗜血菌、福赛斯坦纳菌、齿垢密螺旋体和具核梭杆菌^[4]。本课题研究着重分析安氏 II 类错殆正畸患者矫治前期龈沟液内细菌分布的情况,以利于后期探讨矫正后牙根吸收是否与这些微生物相关奠定基础,本课题研究鉴定出链球菌属 18 株菌种,奈瑟菌属 7 株菌种,放线菌属 6 株菌种,还有少见的细菌,包括罗氏菌属、孪生球菌属、艾肯菌属等。尤其嗜蚀艾肯菌与多种感染有关,是近临床分离出的少见菌株,最近研究表明该菌与慢性根尖周炎^[15]以及口腔夹膜脓肿^[16]有关,同时还与其他感染相关,在前列腺液^[17]以及颈前瘻管液^[18]也能分离出该菌株,可见其致病性不可小视。

总之,牙根吸收因素众多,微生物可能起着十分重要的作用,明确重要的微生物分布以减少牙根吸收的程度具有一定的医学意义。本课题着重分析安氏 II 类错殆正畸患者矫治前期龈沟液菌群分

布情况,为临床采取有效措施提供参考依据。

参 考 文 献:

- [1] Meli PR, Balun EJ, Fale MA, 等. 临床微生物学手册[M]. 徐建国, 梁国栋, 邢来君, 等译. 北京: 科学出版社, 2005: 335-352.
- [2] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. *Clinical Microbiological Reviews*, 2004, 17(4): 840-862.
- [3] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [4] Thorne JL, Kishino H, Painter IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15(12): 1647-1657.
- [5] 谢永建, 麦理想, 王大为, 等. 不同力值对小型猪牙根吸收的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2008, 29(1): 46-50.
- [6] Mavragani M, Bae OE, Wisth PJ. Changes in root enngth during orthodontic treatment: advantages for immature teeth [J]. *Eur J Orthod*, 2002, 24: 91-97.
- [7] Kaley J, Phillips C. Factors related to root resorption in edgewise practice[J]. *Angle Orthodontist*, 1991, 61(2): 125-132.
- [8] 李长霞, 李春雷, 朱双林, 等. 面型对正畸治疗中牙根吸收影响的临床研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2003, 17(3): 243-245.
- [9] Baunrind S, Kom FL, Boyd RL. Apical root resorption in orthodontically treated adults [J]. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 1996, 110(3): 311-323.
- [10] Sameshima GT, Asgarifar KO. Assessment of root resorption and root shape:periapical vs panoramic film[J]. *Angle Orthod*, 2001, 71(3): 185-189.
- [11] 朱效萍, 张宏闯. 大鼠牙移动过程中龈沟液 MMP-2 含量与牙根吸收的相关性研究[J]. *泰州职业技术学院学报*, 2009, 9(3): 40-42.
- [12] Levander E, Malmgren O, Eliasson S. Evaluation of root resorption in relation to two orthodontic treatment regimes. A clinical-experimental study[J]. *Eur J Orthod*, 1994, 16(3): 223-228.
- [13] Chan E, Darendeliler MA. Properties of root cementum:Part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces [J]. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 2005, 127(2): 186-195.
- [14] Uemea M, Contreras A, Chen C, et al. The utility of whole saliva to detect the oral presences of periodontopathic bacteria [J]. *J Periodontol*, 1998, 69(7): 823-828.
- [15] 闫培芳, 梁景平, 李超伦, 等. 慢性根尖周炎根管中 8 种厌氧菌检出分析[J]. *口腔医学*, 2006, 26(4): 250-252.
- [16] 陈相, 陈东科. 侵蚀艾肯菌致口腔颊膜脓肿一例[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(3): 328.
- [17] 常纪, 杜静, 郭晓英. 从前列腺液中分离出嗜蚀艾肯菌 1 例[J]. *黑龙江医药科学*, 2010, 33(1): 109.
- [18] 赵颖, 徐瑞龙, 单小云. 侵蚀艾肯菌致颈前瘻管感染 1 例[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(2): 119.

(张蕾 编辑)