

微小小单胞菌在慢性根尖周炎感染根管中的定植情况分析

方南群

(内江市中医医院,四川 内江 641000)

摘要:目的 探究微小小单胞菌在慢性根尖周炎感染根管中的定植情况。方法 选取收治的、符合纳入标准的慢性根尖周炎病人 138 例,共 150 颗患牙,并采集患牙的根管标本。根据患牙是否为初次治疗,分为初次治疗组($n=75$)和非初次治疗组($n=75$)。对于根管标本做以下处理:应用 16S rDNA PCR 技术,检测微小小单胞菌的 DNA,并比较两组的检出率差异;对标本检测出的牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌与微小小单胞菌进行关联影响分析。结果 检出率:与非初次治疗组相比,初次治疗组的微小小单胞菌检出率较高,差异有统计学意义($P<0.05$);Logistic 回归分析:两组的微小小单胞菌检出情况均与牙髓卟啉单胞菌密切相关($P<0.05$)。结论 微小小单胞菌在慢性根尖周炎定植可能与牙髓卟啉单胞菌存在共生关系。

关键词:微小小单胞菌;慢性根尖周炎;根管;定植

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.024

The analysis of tiny micromonospora in the colonization of root canal in chronic periapical infection

FANG Nanqun

(Neijiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Neijiang, Sichuan 641000, China)

Abstract: Objective To explore the colonization of Parvimonas micra in the root canal of chronic periapical periodontitis. **Methods** A total of 138 cases of chronic periapical periodontitis with the criteria of inclusion criteria were selected and a total of 150 teeth and root canal specimens were collected. According to whether the tooth was first treatment, the cases were divided into initial treatment group ($n=75$) and non-initial treatment group ($n=75$). The DNA of Parvimonas micra from root canal specimens were detected by 16S rDNA PCR. The difference were compared between the two groups. The association effects of porphyrin gingivalis, pulp porphyrin and enterococcus faecalis were analyzed. **Results** Detection rate: Compared with the non-initial treatment group, the detection rate of Parvimonas micra in the first treatment group was higher, with statistical significance ($P<0.05$); Logistic regression analysis: The detection of

- [2] SATOH H, SANO M, SUWA K, et al. Pregnancy-related acute myocardial infarction in Japan: a review of epidemiology, etiology and treatment from case reports[J]. Circ J, 2013, 77(3): 725-733.
- [3] YEH RW, GO AS. Rethinking the epidemiology of acute myocardial infarction: challenges and opportunities[J]. Arch Intern Med, 2010, 170(9): 759-764.
- [4] LÁSZLÓKD, AHNVE S, HALLQVIST J, et al. Job strain predicts recurrent events after a first acute myocardial infarction: the Stockholm Heart Epidemiology Program[J]. J Intern Med, 2010, 267(6): 599-611.
- [5] HE XM, CHEN L, LUO JB, et al. Effects of rhBNP after PCI on non-invasive hemodynamic in acute myocardial infarction patients with left heart failure[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(8): 791-795.
- [6] 曹占伟, 朱洁, 于维雅. 急性心肌梗死 PCI 手术患者的治疗方案研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(5): 948-950.
- [7] 刘洋, 刘恒亮, 赵友民, 等. 老年急性心肌梗死特点及急诊介入治疗近期疗效分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2010, 2(2): 92-94.

- [8] KOHL LP, LEIMBERGER JD, CHISWELL K, et al. Clinical characteristics and outcomes after unplanned intraaortic balloon counterpulsation in the Counterpulsation to Reduce Infarct Size Pre-PCI Acute Myocardial Infarction trial[J]. Am Heart J, 2016, 174(4): 7-13.
- [9] THIELE H, SCHULER G, NEUMANN FJ, et al. Intraaortic balloon counterpulsation in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: design and rationale of the Intraaortic Balloon Pump in Cardiogenic Shock II (IABP-SHOCK II) trial[J]. Am Heart J, 2012, 163(6): 938-945.
- [10] KAPUR NK, PARUCHURI V, MAJITHIA A, et al. Hemodynamic effects of standard versus larger-capacity intraaortic balloon counterpulsation pumps[J]. J Invasive Cardiol, 2015, 27(4): 182-188.
- [11] 冯春光, 杨向军, 付强, 等. 主动脉球囊反搏对再灌注不良的急性前壁心肌梗死患者血浆脑钠素和心功能的影响[J]. 中国全科医学, 2013, 16(1): 43-46.

(收稿日期: 2016-11-04, 修回日期: 2016-12-21)

Parvimonas micra in two groups was closely related to pulp Single ($P < 0.05$). **Conclusion** The colonization of Parvimonas micra in chronic periapical periodontitis may have a symbiotic relationship with pulp Single.

Key words: Parvimonas micra; Chronic periapical periodontitis; Root canal; Colonization

慢性根尖周炎是发生在根管周围组织的慢性炎症性疾病,发病的严重程度取决于根管内细菌的毒力和机体的抵抗力^[1]。有研究表明,微小单胞菌存在于慢性根尖周炎感染的根管当中,其并非独立存在,而是与牙髓优势致病菌共同生活在一个微小环境当中^[2]。目前,国内外有关微小单胞菌与牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌的相关性研究较少,为此,内江市中医医院应用 16S rDNA PCR 技术,检测 150 颗患牙中的微小单胞菌 DNA,并分析其与牙髓优势致病菌之间的相关关系,以探究微小单胞菌在慢性根尖周炎感染根管中的定植情况。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取内江市中医医院收治的 138 例慢性根尖周炎病人,共有 150 颗患牙,根据患牙是否为初次治疗,将患牙分入初次治疗组 ($n = 75$) 和非初次治疗组 ($n = 75$)。病人的平均年龄 (41.89 ± 12.69) 岁。非初次治疗组的选择标准为:(1)符合一般慢性根尖周炎的临床症状和体征;(2)患牙治疗 2 年以上;(3)X 线显示有根尖周愈合不全或出现新的根尖周病^[3];(4)根管填充不全者。本研究经内江市中医医院医学伦理委员会批准,所有病人及其家属均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 (1)1% 氯己定含漱,每次 1 min,并用橡皮障隔离患牙^[4];(2)消毒牙冠和橡皮障:3% H_2O_2 和 2.5% NaOCl^[5];(3)应用无菌高速牙钻去除牙釉质或填充材料;(4)选择具有根尖病变的根管。

1.2.2 微小单胞菌的 DNA 提取 采集的样本常温解冻,并用 DNA 试剂盒提取 DNA。

1.2.3 PCR 检测 应用扩增引物和 16S rDNA 引物进行扩增。获得产物后,电泳、染色、紫外光扫描观察和拍照。

1.2.4 PCR 引物 细菌通用扩增引物:上游:TCGAACGTGATTTTGTGGA;下游:TCCAGAGTTC-CCACCTCT。微小单胞菌:上游:TCGAACGTGATTTTGTGGA;下游:TCCAGAGTTCACCTCT。牙龈卟啉单胞菌:上游:GCGTATGCAACTTGCCT-TAC;下游:GTTTCAACGGCAGGCTAAC。牙髓卟啉单胞菌:上游:GCTGCAGCTCAACTGTAGTC;下游:CCGCTTCATGTCACCATGTC。粪肠球菌:上游:GTTTAGTCCGCATGGCA TAAGAG;下游:CCGT-CAGGGGACGTTTCAG。

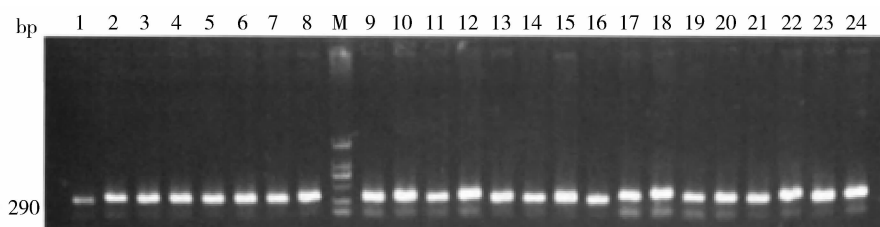
1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。观测资料主要为计数数据,组间比较为 χ^2 检验。此外,应用 Logistic 分析,计算牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌的关联影响关系;检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

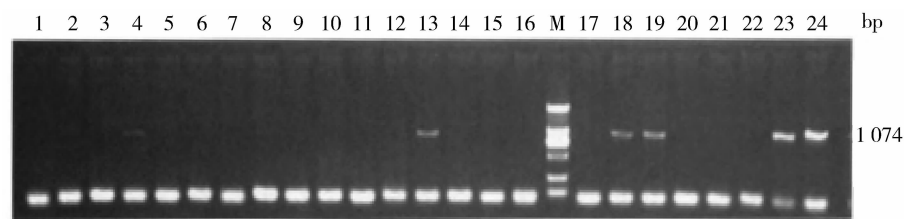
2.1.1 扩增引物结果 扩增引物结果如图 1 所示。可以看出,此次实验结果是优良的,并未受到感染细菌分泌的物质和根管内的成分影响。

2.1.2 16S rDNA 扩增结果 初次治疗组的部分扩增结果见图 2;非初次治疗组的部分扩增结果见图 3。本次实验中,初次治疗组中有 37 例扩增出 1 074 bp 条带,即微小单胞菌的检出率为 49.33% (37/75),而非初次治疗组仅 9 例扩增出 1 074 bp 条带,即微小单胞菌的检出率为 12.00% (9/75)。两组检出率的差异详见表 1。从表 1 可以看出,初次治疗组的检出率显著高于非初次治疗组,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.582, P < 0.001$)。



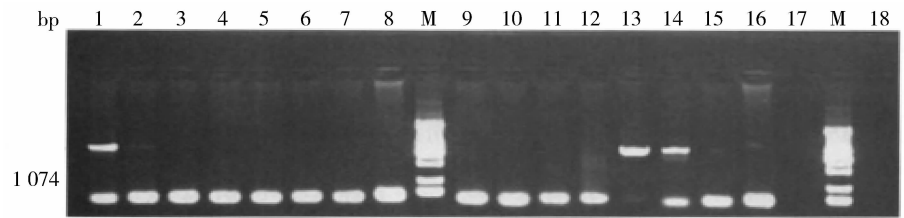
注:M:Marker;1~24 为扩增引物结果。

图 1 扩增引物结果



注:M:Marker;1~24 为微小单胞菌扩增结果。

图2 初次治疗组的部分扩增结果



注:M:Marker;13,14 为阳性对照;17,18 为空白对照;1~12,15,16 为非初次治疗的微小单胞菌扩增结果。

图3 非初次治疗组的部分扩增结果

表1 两组微小单胞菌检出率/例(%)

组别	例数	微小单胞菌阳性
初次治疗组	75	37(49.33)
非初次治疗组	75	9(12.00)
χ^2 值		24.582
P 值		0.000

2.2 微小单胞菌与其它细菌的关联影响分析——Logistic 回归分析 分别以各组(初次治疗组,非初次治疗组)微小单胞菌是否检出为应变量,赋值1=检出(阳性),0=未检出(阴性)。再以牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌等3个指标为自变量,分别赋值1=检出(阳性),0=未检出(阴性)。纳入至 Logistic 回归中。并采用向前法以选择剔除变量。结果:微小单胞菌均与牙龈卟啉单胞菌具有密切的关联影响关系:对初次治疗组而言:OR=2.298,95%CI=1.175~4.492, $P<0.05$;对非初次治疗组而言:OR=2.081,95%CI=1.020~4.428, $P<0.05$ 。但与牙龈卟啉单胞菌、粪肠球菌两个指标关联影响并不密切($P>0.05$)。详见表2。

3 讨论

细菌的分离培养是从混杂的微生物中获得单一菌株的方法,目的在于从被检材料中或者被众多杂菌污染中分离提纯所需的病原菌^[7]。细菌分离培养虽然可以获得纯净的菌株,但其受许多因素的影响,如无菌环境、温度、水分、营养、操作等,且很难将所有细菌进行鉴定,从而对最后结果造成不必

表2 微小单胞菌与牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌相关性

组别	常数	牙龈卟啉单胞菌	牙髓卟啉单胞菌	粪肠球菌
初次治疗组				
Beta	0.351	0.457	0.832	0.371
SE	0.356	0.428	0.342	0.385
OR	1.420	1.579	2.298	1.449
95%CI	0.707~2.854	0.683~3.654	1.175~4.492	0.681~3.082
P 值	0.324	0.286	0.015	0.335
非初次治疗组				
Beta	0.583	0.516	0.733	0.629
SE	0.621	0.671	0.364	0.718
OR	1.791	1.675	2.081	1.876
95%CI	0.530~6.051	0.450~6.241	1.020~4.248	0.459~7.662
P 值	0.348	0.442	0.044	0.381

要的偏倚^[8]。随着医学分子生物学技术的发展,PCR 和核酸杂交单独或结合在一起,已经成为较为经典的核酸检测技术^[9]。PCR 技术具有简便、高度的灵敏性以及特异性等优势,在生物医学、遗传学、法医学等领域得到了广泛的应用。其通过高温变性、中温延伸以及低温退火三个阶段不断重复,可将特异区的 DNA 放大数百万倍。文献表明,PCR 技术检测细菌的灵敏度和特异度显著高于传统的细菌分离培养,是临床检验细菌的“金标准”^[10]。

16S rDNA 是大多数细菌编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,是一种高度保守的基因,被称为“细菌活化石”。有研究表明,16S rRNA 至少有 9 种以上为

细菌所共有,但真核生物没有相类似的基因^[11]。为此,本组选取在2014年12月—2015年12月期间收治的、符合纳入标准的138例慢性根尖周炎病人的150颗患牙,采集患牙的根管标本,应用16S rDNA PCR技术,通过加样、PCR反应、凝胶电泳、分析以及序列测定五个步骤,鉴定微小单胞菌的存在和与牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及粪肠球菌相关关系。有关研究表明,微小单胞菌在慢性根尖周炎病人的根管中的检出率在30%~50%左右,且初次治疗者与非初次治疗者的细菌数量、种类大有不同^[12]。通过本文可以看出,初次治疗组的微小单胞菌的检出率为49.33%(37/75),而非初次治疗组微小单胞菌的检出率仅为12.00%(9/75),可以看出初次治疗组的微小单胞菌的检出率远远超过非初次治疗组,差异有统计学意义($\chi^2=24.582, P<0.001$)。说明,微小单胞菌是慢性根尖周炎重要感染菌之一,根管治疗时,需加强控制,提高根管治疗效果。

有研究表明,慢性根尖周炎根管中检测出牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌和粪肠球菌相对较高,其可能与微小单胞菌存在一定的关系^[13]。在细菌微小环境中,微小单胞菌并非孤立存在的,其可能与其他细菌存在拮抗或共生关系。细菌共生关系可以提高彼此的毒力、抵抗力等,对其致病作用起到重要影响,因此,研究微小单胞菌与其他牙髓优势致病菌之间的关系,可以更好的研究细菌之间的相互关系和致病机制。通过本文可以看出,两组微小单胞菌与牙髓卟啉单胞菌具有相关关系[OR=2.298, 95% CI(1.175~4.492), $P=0.015$; OR=2.081, 95% CI(1.020~4.248), $P=0.044$],但与牙龈卟啉单胞菌、粪肠球菌无相关性。说明微小单胞菌与牙髓卟啉单胞菌可能存在共生关系。牙龈卟啉单胞菌和粪肠球菌可能由于检出率较低,样本量较少,而未发现与微小单胞菌存在相关关系。另有研究表明,牙髓卟啉单胞菌是一种产黑色素类杆菌,可以将血清糖蛋白分解成为多肽或氨基酸,而微小单胞菌可以利用这些多肽和氨基酸作为底物,为自己的生长、繁殖提供所需的物质能量^[14]。更进一步研究证实,微小单胞菌与牙髓卟啉单胞菌可能存在共生关系,两菌同时存在更有利于在慢性根尖周炎感染根管中定植、生长。

综上所述,微小单胞菌在慢性根尖周炎中并非独立存在,而是与多种牙髓优势致病菌共同作用,生活在一个微小的生态环境当中。其与牙髓卟

啉单胞菌可能存在共生关系,两菌通过相互作用可能对致病机制有所影响,但具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 高静,申静,张海峰,等. 锥形束CT与根尖片对实验性根尖周炎根管治疗结果的评估[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(3): 292-294.
- [2] TAKÉ A, NAKASHIMA T, INAHASHI Y, et al. Analyses of the cell-wall peptidoglycan structures in three genera *Micromonospora*, *Catenuloplanes*, and *Couchioplanes* belonging to the family *Micromonosporaceae* by derivatization with FDLA and PMP using LC/MS[J]. J Gen Appl Microbiol, 2016, 62(4): 199-205.
- [3] 王霜剑,唐旭炎. 根管内不同预处理对玻璃纤维桩粘接强度的影响[J]. 安徽医学, 2015, 36(8): 920-923.
- [4] TALUKDAR M, BORDOLOI M, DUTTA PP, et al. Structure elucidation and biological activity of antibacterial compound from *Micromonospora auratinigra*, a soil Actinomycetes[J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(4): 973-987.
- [5] 张文,陈玉荣,何谨,等. 微小单胞菌与牙髓卟啉单胞菌在慢性根尖周炎感染根管中定植的关系研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(1): 147-149.
- [6] CARRO L, RIESCO R, SPRÖER C, et al. *Micromonospora ureilytica* sp. nov., *Micromonospora noduli* sp. nov. and *Micromonospora vinacea* sp. nov., isolated from *Pisum sativum* nodules[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(9): 3509-3514.
- [7] CARRO L, RIESCO R, SPRÖER C, et al. *Micromonospora luteifusca* sp. nov. isolated from cultivated *Pisum sativum*[J]. Syst Appl Microbiol, 2016, 39(4): 237-242.
- [8] PHONGSOPITANUN W, KUDO T, OHKUMA M, et al. *Micromonospora sediminis* sp. nov., isolated from mangrove sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(8): 3235-3240.
- [9] TRABELSI I, OVES D, MANTECA A, et al. Antimicrobial Activities of Some Actinomycetes Isolated from Different Rhizospheric Soils in Tunisia[J]. Curr Microbiol, 2016, 73(2): 220-227.
- [10] 孙文娟,黄楠楠,杨雨虹,等. 截根术治疗下颌磨牙病变疗效观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(12): 1182-1183, 1187.
- [11] THAWAI C, KITTIWONGWATTANA C, THANABORIPAT D, et al. *Micromonospora soli* sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(3): 449-456.
- [12] 王廷斌,李小芳,庄顺红. 根尖周炎瘻管与根管内特殊细菌定植的相关性[J]. 中华全科医学, 2014, 12(4): 571-572, 627.
- [13] 纪海,李红,何艳艳,等. 慢性根尖周炎感染根管中微小单胞菌与牙髓优势致病菌的相关性研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2014, 49(8): 495-499.
- [14] 汪磊,赵兵. 锥形束CT结合显微超声处理上颌第一磨牙近中颊根第2根管钙化的疗效评价[J]. 安徽医学, 2015, 36(1): 49-52.

(收稿日期:2016-08-30,修回日期:2016-10-31)