

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2022.01.004

· 基础研究 ·

牙周源性牙周牙髓联合病变常见病原菌的分布及其意义

江阿力·帕孜力别克¹, 米热阿依克孜·马木提², 赵莉³, 鲁皓²

1. 新疆医科大学口腔医学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830001); 2. 石河子大学口腔医学系, 新疆维吾尔自治区 石河子(832000); 3. 新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830000)

【摘要】 目的 研究牙周源性牙周牙髓联合病变常见病原菌分布及其相关性, 为临床治疗提供依据。
方法 选择2018年1月至2020年6月于新疆维吾尔自治区人民医院口腔科就诊的牙周源性牙周牙髓联合病变患者43例43颗牙作为实验组, 重度牙周炎患者41例41颗牙作为对照组。分别采集根管内组织和龈下菌斑, 构建含有8种待测细菌基因片段的重组质粒, 建立定量标准, 应用实时荧光定量PCR技术检测福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*, Tf)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)、中间普氏菌(*Prevotella intermedia*, Pi)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*, Td)、消化性链球菌(*Digestive streptococcus*, Ds)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Ef)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromanus endodontics*, Pe)数量。
结果 实验组根管内组织与其龈下菌斑中Ds、Pe数量差异无统计学意义($P > 0.05$), 其余6种病原菌数量差异均有统计学意义($P < 0.05$); 实验组与对照组龈下菌斑中Ds数量差异无统计学意义($P = 0.241$), 其余7种病原菌数量差异均有统计学意义($P < 0.05$); 实验组根管内组织与其龈下菌斑中Ef、Pe、Pg、Td、Tf细菌数量密切相关, Ef($r = 0.347, P < 0.05$)、Pe($r = 0.363, P < 0.05$)、Pg($r = 0.437, P < 0.01$)、Td($r = 0.471, P < 0.01$)、Tf($r = 0.679, P < 0.01$)。
结论 牙周源性牙周牙髓联合病变常见病原菌在根管内组织中数量低于龈下菌斑但根管内病原菌数量与龈下菌斑密切相关, 临床治疗期间在控制牙周组织感染的同时, 还应重视牙髓组织感染的控制。

【关键词】 牙周源性; 牙周牙髓联合病变; 病原菌; 分布; 根管内组织; 龈下菌斑; 福赛斯坦纳菌; 牙龈卟啉单胞菌; 具核梭杆菌; 中间普氏菌; 齿垢密螺旋体; 消化性链球菌; 粪肠球菌; 牙髓卟啉单胞菌

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2022)01-0020-07

【引用著录格式】 江阿力·帕孜力别克, 米热阿依克孜·马木提, 赵莉, 等. 牙周源性牙周牙髓联合病变常见病原菌的分布及其意义[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(1): 20-26. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2022.01.004.

Distribution and its significance of the common pathogenic bacteria in teeth combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin PAZILIBIEKE · Jianganli¹, MAMUTI · Mireayikezi², ZHAO Li³, LU Hao². 1. Department of Stomatology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, China; 2. Department of Stomatology, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 3. Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

Corresponding author: ZHAO Li, Email: rmyzhaoli@163.com, Tel: 86-13899972772

【Abstract】 Objective To study the distribution of pathogenic infection and relevance in combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin, and provide the basis for clinical treatment. **Methods** Totally 43 cases of combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin from Jan. 2018 to Jun. 2020 treated in the hospital were selected, including a total of 43 teeth as the experimental group. Another 41 teeth from 41 cases with severe periodontitis during the same period were set as the control group. subgingival plaque samples and root canal samples of ill teeth

【收稿日期】 2021-04-16; **【修回日期】** 2021-07-31

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C101)

【作者简介】 江阿力·帕孜力别克, 硕士研究生, Email: 3313746165@qq.com

【通信作者】 赵莉, 副教授, 硕士, Email: rmyzhaoli@163.com, Tel: 86-13899972772



微信公众号

were made for test. Quantitative Real-time PCR was used to detect the quantity of *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Treponema denticola* (*Td*), *Digestive streptococcus* (*Ds*), *Enterococcus faecalis* (*Ef*), *Porphyromanus endodontics* (*Pe*). **Results** There was no significant difference in the quantity of *Digestive streptococcus* and *Porphyromanus endodontics* in the root canal tissue and subgingival plaque of the experimental group ($P > 0.05$), other six pathogenic bacteria in the subgingival plaque samples was significantly higher than that from the root canal tissue ($P < 0.05$); No significant difference in the quantity of *Digestive streptococcus* was found in the subgingival plaque between the two groups ($P = 0.241$). Other seven pathogenic bacteria in the subgingival plaque samples of the experimental group was significantly higher than that from the control group ($P < 0.05$); The number of *Ef*, *Pe*, *Pg*, *Td* and *Tf* in the root canal tissue was closely related to the subgingival plaque in the experimental group, *Ef* ($r = 0.347, P < 0.05$), *Pe* ($r = 0.363, P < 0.05$), *Pg* ($r = 0.437, P < 0.01$), *Td* ($r = 0.471, P < 0.01$), *Tf* ($r = 0.679, P < 0.01$). **Conclusion** The quantity of common pathogenic bacteria in the root canal tissue of Combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin was lower than that from the subgingival plaque sample, and the quantity of common pathogenic bacteria in the root canal tissue was closely related to the subgingival plaque. During clinical treatment, attention should be paid to the control of pulp tissue infection while controlling periodontal tissue infection.

【Key words】 periodontal origin; periodontal - endodontic lesions; pathogen; distribution; root canal tissue; subgingival plaque; *Tannerella forsythia*; *Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Prevotella intermedia*; *Treponema denticola*; *Digestive streptococcus*; *Enterococcus faecalis*; *Porphyromanus endodontics*

J Prev Treat Stomatol Dis, 2022, 30(1): 20-26.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2017D01C101).

牙周-牙髓联合病变(combined periodontal-endodontic lesions)是发生在牙周病或根尖周病晚期,导致广泛牙周组织破坏及牙髓病变的综合征,是牙齿缺失的重要原因之一^[1]。1999年国际牙科会议分类为:牙髓源性牙周牙髓联合病变、牙周源性牙周牙髓联合病变和并存型牙周牙髓联合病变^[2]。这一分类为病因型分类,缺乏直观指标,临床上原发病变较长时间得不到治疗时,分型鉴别诊断有一定难度。从临床治疗效果看,牙髓源性的牙周牙髓联合病变,仅通过根管治疗即可表现为组织愈合,与牙周源性的病变预后大不相同。牙周源性牙周牙髓联合病变患者往往会因诊断不及时或治疗不规范而病情恶化,最终导致患牙拔除。

牙周源性牙周牙髓联合病变是临床上较常见的一个分型,由于深牙周袋内的细菌、毒素通过根尖孔或近根尖处的侧支根管进入牙髓,导致牙髓组织发生病变^[3]。目前很多研究已证明牙周牙髓联合病变中,牙周和牙髓感染病损中细菌菌群具有相似性。然而对牙周和牙髓组织感染部位细菌数量及其相关性方面的研究极少,本实验应用实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)技术,对牙周源性牙周牙髓联合病变和重度

牙周炎患者分别进行了常见病原菌的检测,并分析牙周源性牙周牙髓联合病变致病菌分布状况及其相关性,为临床治疗提供参考依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择2018年1月至2020年6月于新疆维吾尔自治区人民医院就诊的牙周源性牙周牙髓联合病变者43例,共43颗牙作为实验组,其中男26例,女17例;年龄17~75岁,平均(37.65 ± 11.48)岁。另选重度牙周炎者41例,共41颗牙作为对照组,其中男20例,女21例;年龄15~72岁,平均(36.32 ± 10.76)岁。记录所有研究对象的基本资料、口腔卫生状况、牙龈状况、牙周探诊及牙松动度,拍摄曲面断层片。两组患者的性别、年龄、口腔卫生情况等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审批(审批号:KY20180118157),所有患者已签署的知情同意书。

1.2 纳入和排除标准

实验组纳入标准参考《牙周病学》相关诊断标准^[4]:①有长期的牙周炎病史,近期出现牙髓炎症状,牙冠、牙根完整,无引发牙髓炎的深龋、牙隐裂等牙体硬组织疾病;②深达根尖区的牙周袋或严重

的牙龈退缩;③松动度达Ⅱ度以上;④温度检测可激发剧痛或无反应等异常反应;⑤X线片示病变位点牙槽骨吸收 \geq 根长2/3;⑥临床诊断为逆行性牙髓炎者。排除标准:①患牙有外伤史;②有糖尿病、心血管疾病、高血压等全身系统性疾病;③治疗前6个月进行过牙周治疗;④长期服药史或近1个月内服用过抗生素;⑤口腔专科检查和影像学表现确诊为牙根纵裂的患者;⑥正畸治疗史;⑦牙髓治疗史。

对照组纳入标准^[5]:①探诊深度 > 6 mm;②附着丧失 ≥ 5 mm;③牙槽骨吸收超过根长的1/2;④牙齿松动;⑤炎症较明显,可伴有牙周脓肿;⑥后牙有Ⅱ度或Ⅲ度根分叉病变。诊断为重度牙周炎的患者需要2颗及以上患牙具有上述前3项特征;如仅有2颗患牙,这2颗患牙须不是相邻患牙,且至少位于不同的象限。排除标准:①高血压、糖尿病、类风湿关节炎等全身系统性疾病者;②孕妇和哺乳期患者;③半年内有牙周治疗史或3个月之内有服用抗生素、激素类药物的患者;④吸烟者。

1.3 龈下菌斑与根管内组织的采集与处理

实验组与对照组采样前清除局部龈上菌斑,无菌棉卷隔湿,探诊患牙牙周袋至最深部位,将无菌刮治器置于牙周袋底部,刮取牙周袋内龈下菌斑放入灭菌的EP管中, -80 °C保存。实验组根管内组织的采集:局部麻醉后橡皮障隔离取样牙,开髓,用无菌低速手机在无水状态下揭去髓室顶,用15号K锉探查牙周袋较深侧根管,疏通根管,根管长度测量仪测定基本工作长度。将无菌纸尖放入

根管内,止点为距离根尖孔 $0.5 \sim 2$ mm处,重复3次放入同一EP管中。所有样本均置于冰面上,并及时转送至 -80 °C低温冰箱保存。本实验病例标本均由同一名经过临床培训的牙体牙髓专科医师采集。

1.4 DNA的提取

样本处理:将存于 -80 °C的样本冰上解冻30 min,加1 mL PBS缓冲液,震荡5 min,12 000 rpm离心3 min,留沉淀。应用细菌基因组DNA提取试剂盒(南京诺唯赞,中国)对根管内组织和龈下菌斑标本DNA进行提取。提取方法严格参照试剂盒操作手册。分光光度计检测DNA浓度范围 $0.02 \sim 20$ ng/ μ L,提取的DNA样品 -20 °C保存。

1.5 实时荧光定量PCR技术检出微生物

1.5.1 引物设计 对病原微生物消化性链球菌(*Digestive streptococcus, Ds*) ATCC27337、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis, Ef*) ATCC29200、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromanus endodontics, Pe*) ATCC35406、中间普氏菌(*Prevotella intermedia, Pi*) ATCC25611、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis, Pg*) ATCC33277、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia, Tf*) ATCC43037、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola, Td*) ATCC35405及具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum, Fn*) ATCC25586的特异性引物序列使用PrimerQuest进行设计,引物扩增序列参考人类口腔微生物数据库(expanded Human Oral Microbiome Database, eHOMD)。细菌16S rRNA的引物序列信息由生物公司合成,见表1。

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 Primer sequences of the quantitative real-time PCR

Bacteria	Target gene	Primers (5'-3')	Product/bp
<i>Digestive streptococcus</i>	16S rRNA	F:CTAGAGAGACTGCCAGGGATAA R:GCCTACAATCCGAAGTGAAT	166
<i>Enterococcus faecalis</i>	16S rRNA	F:CCTGACGGTATCTAACCAGAAAG R:GCACTCAAGTCTCCAGTTT	182
<i>Porphyromanus endodontics</i>	16S rRNA	F:GTCTTGCCGTGAAACTGATATG R:CATCGTTTACTGCGTGGACTA	194
<i>Prevotella intermedia</i>	16S rRNA	F:CCGTTGAAAAGACGGCCTAATA R:CCGTGTCTCAGTTCCAATGT	182
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	16S rRNA	F:GCGTAGGTTGTTGCGTAAGT R:TTCAGTGTCTCAGTCCAGTATG	182
<i>Treponema denticola</i>	16S rRNA	F:GGACACATTGGACTGAGATAC R:CGCATGACTACCGTCATCAA	187
<i>Tannerella forsythia</i>	16S rRNA	F:GGAGGATGCGAGCGTTATC R:GGAGTTCTGCGTGATCTCTATG	184
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	16S rRNA	F:ACAGAAGAAGTGACGGCTAAATACG R:TGTTTGTACCCACGCTTTCCG	293

1.5.2 标准品制备 以 *Ds*、*Ef*、*Pe*、*Pi*、*Pg*、*Tf*、*Td* 和 *Fn* 的基因组 DNA 做模板,分别用各自的特异性引物扩增得到目的序列后,构建含有 8 种细菌靶基因的重组质粒,然后使用质粒小提试剂盒(离心柱型)(TIANGEN, 中国)提取质粒 DNA 并送上海生工测序,与 NCBI 的 GenBank 数据库中序列进行同源性分析。扩增产物与 GenBank 中的目的细菌有 100% 同源性,且无其他非特异性产物扩增,说明该样本含有目的细菌。

1.5.3 标准曲线绘制 将标准品细菌基因组 DNA 浓度调整到 1 ng/ μL 。以 10 的倍比 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$) 连续稀释各细菌的基因组 DNA,设置 6 个梯度,以此为模版,进行 QRT-PCR 反应。其反应体系均为 20 μL : 2 \times master mix (10.0 μL), Primer (10 pm) mix (1.2 μL), Template (1.0 μL), ddH₂O (7.8 μL)。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 循环 55 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 10 min; 最后降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增的物质储存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5.4 标本处理 将根管内组织和龈下菌斑标本 DNA 进行 Realtime PCR, 每份样本重复 3 次, 取其

平均值。Realtime PCR 时, 选取构建的质粒作为标准品 (Standard), 同时设置一个无 template 的空白阴性对照 (NTC), 进行绝对定量的分析。

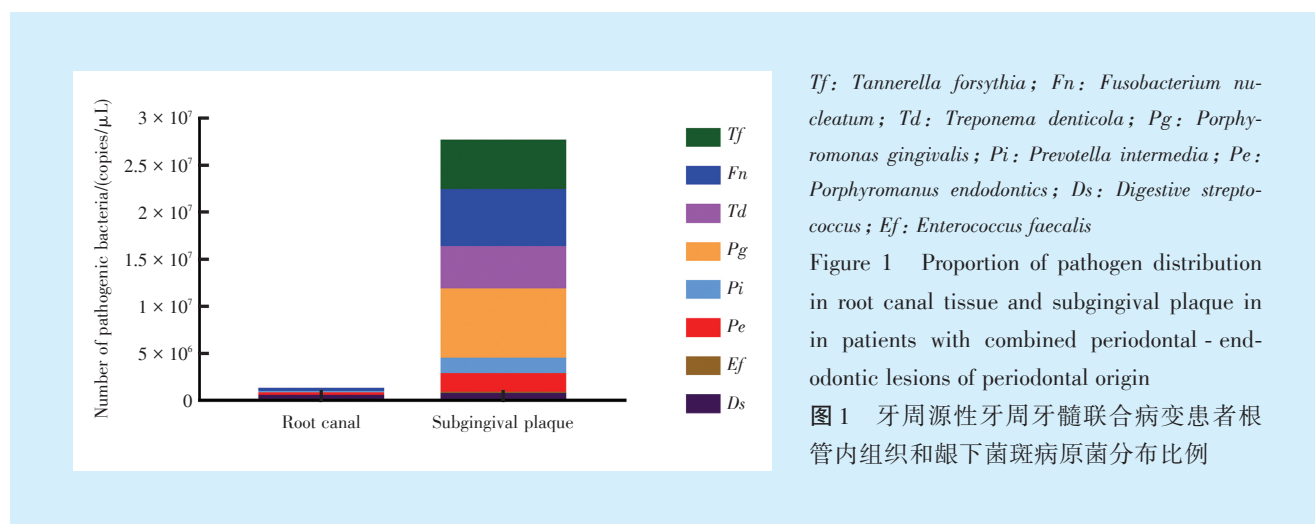
1.6 统计学分析

应用 SPSS25.0 统计软件, 定量资料正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 偏态分布以 M (IQR) 表示。定量资料组内比较符合正态分布时采用配对样本 *t* 检验, 不符合时采用配对样本非参数 Wilcoxon 检验。组间比较, 符合正态分布时采用两独立样本 *t* 检验, 不符合时采用两独立样本非参数 U 检验 (Mann-Whitney U test)。根管内组织和龈下菌斑细菌数量关系用斯皮尔曼秩相关分析。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 实验组根管内组织和龈下菌斑病原菌分布比例

根管内和龈下菌斑中均能检出 8 种病原菌, 根管内分布最多的病原菌为 *Ds*、*Pe*、*Fn*; 龈下菌斑分布最多的为 *Pg*、*Fn*、*Tf*、*Td*、*Pe* 及 *Pi*, 见图 1。



2.2 实验组根管内组织与其龈下菌斑病原菌数量及实验组与对照组龈下菌斑病原菌数量比较

采用配对样本非参数 Wilcoxon 检验比较实验组根管内组织与龈下菌斑病原菌数量, 结果显示, *Ds*、*Pe* 数量差异无统计学意义 ($P = 0.263$ 、 $P = 0.277$), 其余 6 种病原菌数量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。对实验组与对照组龈下菌斑标本病原菌数量进行两独立样本非参数 U 检验 (Mann-Whitney U test) 发现 *Ds* 数量差异无统计学

意义 ($P = 0.241$), 其余 7 种病原菌数量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 斯皮尔曼秩相关分析实验组根管内组织与其龈下菌斑细菌数量的关系

结果显示实验组根管内组织与龈下菌斑中 *Ef* ($r = 0.347$, $P < 0.05$)、*Pe* ($r = 0.363$, $P < 0.05$)、*Pg* ($r = 0.437$, $P < 0.01$)、*Td* ($r = 0.471$, $P < 0.01$)、*Tf* ($r = 0.679$, $P < 0.01$) 数量呈正相关, 见表 4。

表2 牙周源性牙周牙髓联合病变患牙根管内组织和龈下菌斑病原菌数量比较

Table 2 Number of pathogens in root canal tissues and subgingival plaque in teeth with combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin M(IQR)

Pathogenic bacteria	Numer of pathogenic bacteria/(copies/ μ L)		χ^2	P
	Root canal tissues	Subgingival plaque		
<i>Digestive streptococcus</i>	339 755(1 093 553)	582 602(5 466 638)	-1.120	0.263
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 171(31 898)	113 641(317 770)	-2.191	0.028
<i>Porphyromanus endodontics</i>	298 095(2 167 042)	1 955 692(4 877 550)	-1.088	0.277
<i>Prevotella intermedia</i>	96 509(1 318 481)	1 681 553(55 037 770)	-2.808	0.005
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	31 034(588 399)	7 335 776(29 143 269)	-3.750	<0.001
<i>Treponema denticola</i>	6 580(101 880)	4 522 728(14 350 059)	-4.107	<0.001
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	341 529(1 617 985)	6 051 959(19 542 239)	-4.107	<0.001
<i>Tannerella forsythia</i>	19 363(121 811)	5 248 072(13 549 941)	-4.107	<0.001

表3 牙周源性牙周牙髓联合病变患牙和重度牙周炎患牙龈下菌斑病原菌数量比较

Table 3 Comparison of the number of subgingival plaque pathogens between teeth with combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin and teeth with severe periodontitis M(IQR)

Pathogenic bacteria	Numer of pathogenic bacteria in subgingival plaque/(copies/ μ L)		χ^2	P
	Severe periodontitis	Combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin		
<i>Digestive streptococcus</i>	377 958(1 238 260)	582 602(5 466 638)	-1.174	0.241
<i>Enterococcus faecalis</i>	20 278(63 352)	113 641(317 770)	-2.669	0.007
<i>Porphyromanus endodontics</i>	661 811(1 528 839)	1 955 692(4 877 550)	-2.277	0.023
<i>Prevotella intermedia</i>	422 982(2 501 130)	1 681 553(55 037 770)	-2.676	0.007
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	505 530(10 468 139)	7 335 776(29 143 269)	-2.371	0.018
<i>Treponema denticola</i>	188 754(437 667)	4 522 728(14 350 059)	-5.070	<0.001
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1295 858(2 759 967)	6 051 959(19 542 239)	-3.357	0.001
<i>Tannerella forsythia</i>	109 804(929 741)	5 248 072(13 549 941)	-3.333	0.001

表4 牙周源性牙周牙髓联合病变患牙根管内组织与其龈下菌斑细菌数量的相关性分析

Table 4 Relationship between the number of bacteria in root canal tissues and subgingival plaque in teeth with combined periodontal-endodontic lesions of periodontal origin

Indicators	Root canal tissues							
	<i>Ds</i>	<i>Ef</i>	<i>Pe</i>	<i>Pi</i>	<i>Pg</i>	<i>Td</i>	<i>Fn</i>	<i>Tf</i>
Subgingival plaque	$r = 0.123$	$r = 0.347^*$	$r = 0.363^*$	$r = 0.270$	$r = 0.437^{**}$	$r = 0.471^{**}$	$r = 0.178$	$r = 0.679^{**}$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Ds*: *Digestive streptococcus*; *Ef*: *Enterococcus faecalis*; *Pe*: *Porphyromanus endodontics*; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Td*: *Treponema denticola*; *Tf*: *Tannerella forsythia*

3 讨论

牙髓组织与牙周组织解剖结构互通,两者的病变常发生交叉感染,因而导致联合病变的发生。近年研究发现,导致单纯牙髓炎和牙周病的微生物属于不同的菌种,而且不同的感染微生物对组织的破坏机制的不同会导致疾病的临床表现也不尽相同^[6]。此外,不同深度牙周袋中的微生物也会受到局部环境影响,而深牙周袋是常见的导致牙周源性牙周牙髓联合病变的牙周病损^[7]。

牙周可疑致病菌主要有 *Pg*, *Td*, *Tf*, *Fn*, *Pi* 等^[8]。本实验应用 qRT-PCR 技术对以上 8 种病原

菌进行检测,结果显示实验组根管内及两组龈下菌斑中均能检测到这些细菌。实验组根管内分布最多的病原菌为 *Ds*、*Pe*、*Fn*; 龈下菌斑分布最多的为 *Pg*、*Fn*、*Tf*、*Td*、*Pe* 及 *Pi*。说明牙周源性牙周牙髓联合病变患牙牙周组织和牙髓组织中的菌群结构和组成具有相似性但数量上存在差异性。杨万娟等^[9]检测牙周炎患者龈下菌斑菌群发现,广泛型侵袭性牙周炎(generalized aggressive periodontitis, GAgP)和重度慢性牙周炎(severe chronic periodontitis, SCP)患者的优势菌群相似,均包括拟杆菌门、卟啉单胞菌属和 *Pe* 等。本实验两组龈下菌斑检出

的病原菌组成与其结果相似, *Ef* 占的比重最小。*Ef* 首先从持续性根尖周炎中被分离出, 随后在很多其他的牙髓感染中被依次检出, 在难治性根尖周炎根管中的发现率较高。

Pereira 等^[10]研究发现, 在牙周牙髓联合病变患者的牙髓组织中可检出主要存在于牙周的 *Pi*, *Pg* 等。国内外学者通过 PCR-DGGE 凝胶电泳分析后认为根管内的微生物与牙周袋内的非常相似^[11-12]。本实验在这些研究的基础上检测了牙周源性牙周牙髓联合病变者根管及牙周袋内病原微生物数量, 结果发现根管内除了 *Ds* 和 *Pe* 外, 其余 6 种常见病原菌与龈下菌斑病原菌数量均有显著差异, 推测牙周源性牙周牙髓联合病变根管内样本因髓腔处于相对封闭状态, 病原微生物仅通过根尖孔和牙本质小管进入根管系统, 因此细菌检出量较少, 而牙周袋较封闭的根管系统更加开放, 从而有更多的病原微生物进入牙周袋内。

牙周病变中致病微生物所产生的毒性产物可通过侧支根管和副根管进入牙髓组织内, 导致牙髓组织发生病变。龈下刮治或根面平整术后牙齿根面牙骨质缺损也会导致牙本质小管暴露, 即使不存在侧支根管和副根管, 细菌也可通过牙本质小管进入牙髓组织^[13]。另有研究报道中度到重度慢性牙周炎可影响牙髓组织发生病变, 牙本质小管可作为细菌在牙髓组织和牙周组织间传播感染的通道^[14]。本实验通过对牙周源性牙周牙髓联合病患牙和重度牙周炎患牙龈下菌斑检出的细菌数量进行分析发现, 除 *Ds* 外, 其余 7 种病原菌数量均有显著差异, 牙周源性牙周牙髓联合病变牙周袋内细菌检测数量显著高于重度牙周炎患牙, 与 Holt 等^[15]研究结果一致。牙周原发病变较长时间得不到治疗时, 牙周袋内致病菌数量会持续增加, 可通过深牙周袋经根尖区或侧支根管进入牙髓组织内, 使发生继发性牙髓炎的风险增大。尽管牙周牙髓联合病变患牙和牙周炎患牙都有致病菌定植, 但炎症部位致病菌的数量和分布有所不同, 只有当致病菌数量达到某一临界值时才会引起牙髓组织炎症。

Nonnenmacher 等^[16]研究认为在牙周炎发展过程中牙周炎症部位细菌数量可能是关键, 牙周健康与牙周炎的主要区别并不是致病菌检出率不同, 而是阳性样本中致病菌数量的差异。只有细菌存在不一定导致牙周炎发生, 牙周炎的发生发展与宿主防御机制、细菌之间相互作用、细菌在牙

周定居的数量水平等诸多因素有关。本实验通过分析牙周源性牙周牙髓联合病变者根管和龈下菌斑细菌数量的关系发现, *Ef*、*Pe*、*Pg*、*Td*、*Tf* 细菌在根管内与牙菌斑中的数量具有高度相关性, 表明这些病原菌可能在逆行性牙髓炎的发生发展过程中扮演了较重要的角色。其中 *Pe*、*Pg* 是感染根管内最常见的优势菌, *Ef* 在原发和继发的感染根管内均能被检出。Wara-aswapati 等^[17]的研究结果表明, 在牙周炎患者龈下菌斑中 *Pg*、*Tf*、*Td* 细菌之间存在强烈的共聚积作用, 细菌间的黏附具有特异性和较强的致病关联性, 提示这 3 种致病菌可能是逆行性牙髓炎牙髓组织感染的主要致病菌。此外, 许多研究结果证实龈下菌斑中细菌数量水平与牙周袋深度之间存在相关性, 随着牙周袋加深, 牙周袋内致病菌数量相应增加, 细菌之间的致病菌协同致病作用更显著^[18]。随着牙周炎的进一步发展, 牙槽骨的破坏常达根尖 1/3, 而此处常常是侧枝根管、根尖分歧最常分布的区域, 为牙周袋内的微生物进入牙髓组织提供了更多的解剖通道, 侵入牙髓组织的细菌数量也增多, 逐渐引发牙髓的退行性变, 进而导致牙髓病变^[19]。而整个根管系统内也是无氧环境, 利于这些厌氧菌生长繁殖, 在牙周和牙髓两种组织中相互扩散和影响使病变加重^[20]。

牙周源性牙周牙髓联合病变常见病原菌在根管内数量低于龈下菌斑且根管内病原菌数量与龈下菌斑密切相关, 建议牙周感染患者应及时进行合理的治疗, 以降低其发展成为牙周牙髓联合病变的风险。

【Author contributions】 J·Pazilibieke performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. M·Mamuti performed the experiments and analyzed the data. Zhao L designed the study, collected case material and reviewed the article. Lu H reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] 应于康, 罗军, 陶丹, 等. 牙周源性牙周牙髓联合病变感染患者病原体特点及相关因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(24): 5650-5652+5672. doi:10.11816/cn.ni.2017-170635. Ying YK, Luo J, Tao D, et al. Pathogenic characteristic and risk factors of infected patients with periodontal origin periodontal combined pulp lesions[J]. Chin J Nosocomiol, 2017, 27(24): 5650-5652+5672. doi:10.11816/cn.ni.2017-170635.
- [2] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions[J]. Ann Periodontol, 1999, 4(1): 1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1.

- [3] Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, et al. Microbiomes of endodontic - periodontal lesions before and after chemomechanical preparation[J]. J Endod, 2015, 41(12): 1975-1984. doi:10.1016/j.joen.2015.08.022.
- [4] 孟焕新. 牙周病学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 165-169.
Meng HX. Periodontology[M]. 5 th. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020: 165-169.
- [5] 欧阳翔英. 关于重度牙周炎的诊断标准[J]. 中华口腔医学杂志, 2017, 52(2): 72-74. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2017.02.003.
Ouyang XY. State of the art diagnostic criteria of severe periodontitis[J]. Chin J Stomatol, 2017, 52 (2) : 72-74. doi:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2017.02.003.
- [6] Victor DJ, Subramanian S, Prakash P, et al. Putative periodontal pathogens in persisting periodontal pockets of endodontic origin [J]. J Indian Soc Periodontol, 2021, 25(1): 17-21. doi: 10.4103/jisp.jisp_397_20.
- [7] Tiwari S, Saxena S, Kumari A, et al. Detection of red complex bacteria, *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia* in infected root canals and their association with clinical signs and symptoms[J]. J Family Med Prim Care. 2020, 9(4): 1915 - 1920. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1177_19.
- [8] 孟焕新. 牙周病学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 53-61.
Meng HX. Periodontology[M]. 5 th. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020: 53-61.
- [9] 杨万娟, 徐杰. 牙周炎患者龈下菌斑菌群的高通量测序分析 [J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(3): 157 - 165. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.003.
Yang WJ, Xu J. High-density sequencing analysis of subgingival plaque flora in patients with periodontitis [J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(3): 157-165. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.003.
- [10] Pereira CV, Stipp RN, Fonseca DC, et al. Detection and clonal analysis of anaerobic bacteria associated to endodontic-periodontal lesions[J]. J periodontol. 2011, 82(12): 1767-1775. doi: 10.1902/jop.2011.110063.
- [11] Jun HK, Jung YJ, Choi BK. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia* induce cell death and release of endogenous danger signals[J]. Arch Oral Biol, 2017, 73: 72-78. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.010.
- [12] Li H, Guan R, Sun J, et al. Bacteria community study of combined periodontal-endodontic lesions using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing analysis[J]. J Periodontol, 2014, 85 (10): 1442-1449. doi: 10.1902/jop.2014.130572.
- [13] Nair RR, Nayak M, Prasada LK, et al. PCR-based detection of three anaerobic bacteria associated with endodontic-periodontic lesions in type-2 diabetic and nondiabetic subjects[J]. J Conserv Dent, 2019, 22(5): 430-435. doi: 10.4103/JCD.JCD_326_19.
- [14] Okada A, Sogabe K, Takeuchi H, et al. Characterization of specimens obtained by different sampling methods for evaluation of periodontal bacteria[J]. J Oral Sci, 2017, 59(4): 491-498. doi: 10.2334/josnusd.16-0573.
- [15] Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis[J]. Periodontol 2000, 2005, 38(38): 72-122. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x.
- [16] Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, et al. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients[J]. J Periodontol. 2005, 76(9): 1542-1549. doi: 10.1902/jop.2005.76.9.1542.
- [17] Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, et al. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population[J]. Oral Dis. 2009, 15(5): 354-359. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01562.x.
- [18] Das AC, Sahoo SK, Parihar AS, et al. Evaluation of role of periodontal pathogens in endodontic periodontal diseases[J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(1): 239-242. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_725_19.
- [19] Zahran S, Witherden E, Mannocci F, et al. Characterization of root canal microbiota in teeth diagnosed with irreversible pulpitis[J]. J Endod, 2021, 47(3): 415-423. doi: 10.1016/j.joen.2020.12.009.
- [20] Rovai E, Matos FS, Kerbauy WD, et al. Microbial profile and endotoxin levels in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement[J]. Braz Dent J, 2019, 30(4): 356-362. doi: 10.1590/0103-6440201902471.

(编辑 周春华)



官网