

PCR 和核酸探针在临床尖周炎检测中应用的对比研究

刘鲁川 史俊南 吉昌华

摘要 采用聚合酶链反应(PCR)和核酸探针杂交技术,检测了100例临床尖周炎患牙根管内标本中牙龈卟啉菌(Pg)的分布,并对两种方法进行了对比研究。结果显示:PCR对尖周炎中Pg的检出率为74%,核酸探针为76%,两者的总符合率达到94%;在两种方法检测的所有项目对比组之间均未见显著性差异($P > 0.05$);Pg与尖周炎临床症状中的自发痛、叩痛、臭味和尖周肿胀有关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示PCR和核酸探针技术均具有准确、快速、方便的优点,适用于对临床采样标本的直接检测。

关键词 PCR 核酸探针 细菌学检测 牙龈卟啉菌

口腔厌氧菌与口腔感染性疾病密切相关,但由于口腔菌群复杂,厌氧菌的生长条件有严格的限制,分离鉴定困难,因此需摸索一套客观准确、快速方便的检测手段。聚合酶链反应(PCR)和核酸探针技术是近年才兴起的建立在分子水平基础上的检测方法^{1,2}。本研究将两种方法同时应用于临床尖周炎标本中牙龈卟啉菌(Pg)的检测,进而对其进行对比探讨,以期为临床应用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 病例选择

随机选择门诊就诊尖周炎患者100名,年龄9~64岁,男性55例,女性45例。要求患者:6个月内未服用过抗生素;临床确诊为尖周炎的患牙且无明显牙周病变;根管通畅者。分为慢性尖周炎和慢性尖周炎急性发作两类。

标本收集:确诊后患者用口洁素漱口并洁治患牙,即将患牙周围用1%碘酒消毒,开髓,隔湿。开通根管,用无菌纸捻两根分别插入根尖孔处,10s后取出,将其下端约8mm长剪下,随机一根放入装有100 μ l细菌裂解液(10nmol/L Tris-HCl pH7.8, 10nmol/L EDTA, 1% Triton X-100)小管中,以备作PCR检测;另一根放入装有100 μ l细菌变性液(0.5mol/L NaOH, 0.3%十二烷基硫酸钠 SDS)小管中,以备作核酸探针杂交检测,均在漩涡振荡器上振荡10s,使样本充分混匀,-20℃冷冻保存或直接检测。

1.2 PCR 检测³

1.2.1 模板制备 将浸有样本的细菌裂解液振荡混匀,煮沸5min,12000r/min离心10min,取上清用作PCR扩增模板。

1.2.2 PCR 扩增 根据Dickinson发表的特异Pg菌毛亚单位蛋白基因序列⁴,设计一对引物,扩增片段为该基因5'端504~1045bp,总长度542bp。设总反应体积为33 μ l,其中含dNTP2 μ l,5 \times PCR缓冲液6 μ l,引物1 μ l,TagDNA聚合酶0.5 μ l(2U),模板5 μ l,蒸馏水18.5 μ l,混匀后加30 μ l甘油覆盖混合液。反应按94℃变性30s,55℃退火1min,72℃延伸1min为一个周期,用XL-100A扩增仪(西安新骊微电子公司)循环35次,取10 μ l于1.2%琼脂糖凝胶中电泳分离,用P-1紫外分析仪观察结果。

1.3 核酸探针检测⁵

1.3.1 探针的制备 将PCR扩增的Pg特异基因片段作为探针来源,用³²P作为标记物,采用切口平移法进行标记。

1.3.2 样本固定 将浸有样本的细菌变性液充分混匀,煮沸10min,冰水中骤冷后加等体积0.5mol/L HCl中和,取10 μ l真空抽滤于硝酸纤维素滤膜(NC)上,80℃真空烘烤3h,取出装入塑料袋内封口。

1.3.3 探针与NC膜的杂交 将NC膜浸于10ml预杂交液中,42℃温育过夜,换新鲜预杂交液后加入变性探针,42℃杂交过夜。洗膜后置NC膜于感光屏中曝光12~24h,显影观察结果。

2 结果

观察两种方法检测尖周炎Pg阳性率,Pg与尖

作者单位:710032 第四军医大学口腔医学院(刘鲁川现在华西医科大学临床医学博士后流动站,史俊南),生物化学教研室(吉昌华)

周炎临床症状的关系及统计分析结果见表 1~ 3。

表 1 两种方法检测尖周炎 *Pg* 阳性率比较

检测方法	检查例数	检出例数	检出率 (%)	配对卡方检验
PCR	100	74	74	$P > 0.05$
探针	100	76	76	

表 1 中 2 例 PCR+、探针-；4 例 PCR-、探针+，不一致共 6 例，总一致率为 94%。

表 2 两种方法检测慢性或慢性尖周炎急性发作 *Pg* 阳性率比较

临床分类	检查例数	检出例数及检出率 (%)		χ^2 检验
		PCR	探针	
急性	29	24(82.76)	24(82.76)	$P > 0.05$
慢性	71	50(70.42)	52(73.24)	

表 2 经 χ^2 检验，急、慢性尖周炎的 *Pg* 阳性率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 3 两种方法检测 *Pg* 与尖周炎临床症状关系的比较

临床症状	检查例数	检出例数及检出率 (%)		<i>P</i> 值
		PCR	探针	
自发痛	有	64(90.14)	66(92.96)	< 0.05
	无	10(34.48)	10(34.48)	
叩痛	有	67(85.89)	68(87.18)	< 0.05
	无	7(31.82)	8(36.36)	
臭味	有	42(93.33)	42(93.33)	< 0.05
	无	55(57.14)	34(61.82)	
窦道	有	15(71.43)	16(76.19)	> 0.05
	无	79(74.68)	60(75.95)	
肿胀	有	22(95.65)	22(95.65)	< 0.05
	无	77(67.53)	54(70.13)	

经 χ^2 检验，*Pg* 阳性率在尖周炎临床症状中的自发痛、叩痛、臭味和尖周肿胀的有无之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

Pg 是目前较一致公认的牙周致病菌，也发现其与牙髓、尖周的感染有关^{6,7}，况且，牙周袋中的细菌可引起牙髓、根管内的感染，而根管中的感染也可导致牙周的病变，两者的细菌生态是相似的⁸。因此，应进一步探明 *Pg* 与尖周感染的关系。由于传统检测厌氧菌的方法步骤繁琐、操作困难、费时耗力，而且准确性差，妨碍了对其进行广泛深入的研究。可见，开发出准确、快速检测该菌的检测试剂具有实际意义。PCR 扩增是较新的检测手段，

近几年以其高度的特异性和灵敏性广泛用于医学领域。它是一种在体外人工酶促合成 DNA 的技术，可在短时间内使特异 DNA 产物扩增倍数的实际值达 $10^5 \sim 10^7$ ，从而达到准确、快速鉴定细菌的目的。核酸探针是一段含有特异核苷酸序列的带标记的 DNA 分子，用来检测与其互补的序列同样可从分子水平上揭示细菌之间的内在联系。作者曾根据 *Pg* 菌毛亚单位蛋白基因序列设计引物，采用 PCR 技术扩增了其中 542bp 长的特异片段，并与 20 株国际标准株和 6 株临床分离鉴定菌株进行了特异性鉴定，发现该引物能从同种菌中扩增出相同大小的特异片段，而在其它异种菌中（包括相关性较强的牙髓卟啉菌、中间普里沃氏菌、产黑普里沃氏菌等）不能扩增出产物。将该片段用核素标记成探针与 26 株细菌进行杂交，得到同样结果，证实了其高度的特异性^{3,5}。因此，采用这两种方法同时应用于尖周炎标本中 *Pg* 的检测，进而探讨其可行性和实用性。

从本组实验结果分析，PCR 和核酸探针检测尖周炎中 *Pg* 阳性率的结果基本一致，两种方法的符合率达到 94%，说明两者均具有准确、快速、方便的优点，适用于直接检测临床采样标本。

此外，本结果显示，*Pg* 与尖周炎临床症状中的自发痛、叩痛、臭味和尖周肿胀有密切关系，而与窦道的有无无显著关系。*Pg* 是产黑色素类杆菌群中毒力最强的菌株之一，它能产生多种致病毒力因子，包括蛋白酶、胶原酶、细菌裂解产物以及本身的特殊结构如菌毛等，这些物质可破坏组织，参与机体的免疫反应，刺激骨吸收和妨碍修复组织的形成等^{7,9}。提示 *Pg* 可能系尖周炎的致病菌之一。

对比两种检测手段的优劣发现：PCR 技术具有操作简便，出结果快（只需几小时）的优点，但降低成本是值得重视的问题。核酸探针杂交成本相对低廉，一次可完成大量标本的检测，但简化操作步骤也是有待解决的问题。总体上看，这两种方法都是建立在分子水平上的检测方法，其在特异性和敏感性上大大优于传统检测方法^{1,10}，因而结果更为可靠和可信，而且相互间还可取长补短，甚至可利用 PCR 和核酸探针的双重控制提高检测的敏感性。进一步可扩大到对其它可疑致病菌的研究。这将为口腔细菌学鉴定提供较好的手段，对广泛开展口腔细菌流行病学调查，探明细菌的致病机理，协

助对疾病的准确诊断, 指导进行疾病的防治乃至对疗效的评价等均有重要意义。

4 参考文献

- 1 Watanabe K, Frommel TO. Detection of *Prothomonas gingivalis* in oral samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res*, 1993, 72(6): 1040
- 2 林万明主编. 临床基因探针诊断实验技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 3~ 233
- 3 刘鲁川, 吉昌华, 史俊南. 牙龈卟啉菌特异片段的体外扩增和鉴定. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1994, 3(3): 139
- 4 Dickinson DP, Kubiniec MA, Yoshimura F, et al. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*, 1988, 170(4): 1658
- 5 刘鲁川, 吉昌华, 史俊南. 牙龈卟啉菌核酸探针的制备、鉴定. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1994, 4(4): 200
- 6 Haapasalo M. *Bacteroides* spp. In dental root canal infections. *EndodDent Traumatol*, 1989, 5: 1
- 7 Van W. The role of black-pigmented bacteroides in oral infection. *J Clin Periodontol*, 1988, 15(3): 145
- 8 Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, et al. The microbial flora from root canals and periodontitis. *Int Endodontic J*, 1990, 23: 100
- 9 Kawata Y, Hanazawa S, Amano S, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. *Infect Immun*, 1994, 62(7): 3012
- 10 Loesche W J, Lopatin D E, Stoll J, et al. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol*, 1992, 30(2): 418
(1996- 04- 05 收稿, 1997- 03- 28 修回)

A Comparative Study of Application of PCR Technique and P_g Nucleic Acid Probe in Clinical Examination of Apical Periodontitis

Liu Luchuan, Shi Junnan, Ji Changhua

School of Stomatology, the Fourth Military Medical University

Abstract

By PCR technique and P_g nucleic acid probe, the authors investigated the P_g distribution in root canal samples from patients with clinical apical periodontitis and made a comparative study of the two methods. The results showed that: P_g positive rate of apical periodontitis samples by PCR examination was 74% and that of by nucleic acid probe examination was 76%, and their total coincidence rate reached 94%; between comparative groups there was no significant difference ($P > 0.05$) in all data by two examination methods; P_g was closely related with clinical symptoms of apical periodontitis such as spontaneous pain, percussion pain, fetidity and periapical abscess. This indicates that the two methods are accurate, quick and convenient and can both be used in direct examination of clinical samples.

Key words: PCR nucleic acid probe bacterial detection porphyromonas gingivalis

(上接第 289 页)

The Effect of Indirect Trauma on the Goat Temporomandibular Joint: A Histopathologic Study

Hu Kaijin, Wang Dazhang, Li Mingzhe

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The aim of this experiment was to study the effect of indirect trauma on the goat temporomandibular joint (TMJ). Trauma to the TMJ was achieved through an impact to the right mandibular angles of 20 goats, their left TMJs were used as controls. The animals were killed after 2h, 1 month, 3 months and 6 months. Light microscopic observations revealed that the condyles exhibited an eburnated, eroded surface with osteophytes, the disks were thinned or perforated, and the temporal surfaces were thickened and the lining were separated. These changes were histologically similar to those of the advanced osteoarthritis. This study suggests that the indirect trauma on TMJ lead to osteoarthritis.

Key words: TMJ trauma osteoarthritis internal derangement of TMJ