

具核梭杆菌生物学特性及检测手段的研究进展

郭杨¹ 张玉杰²综述 肖水清²审校

(1. 滨州医学院口腔学院正畸教研室 滨州 256603;

2. 济南市口腔医院正畸科 济南 250001)

[摘要] 具核梭杆菌是牙周炎主要致病菌之一, 在口腔乃至全身感染性疾病中检出率极高, 与临床厌氧菌感染的关系十分密切。具核梭杆菌具有明显的毒力或致病性, 可通过多种机制干扰宿主防御能力, 引发牙周组织破坏。本文描述了具核梭杆菌的一些重要特性, 包括其生物学特征、分类和毒性特征以及主要的生物学检测手段, 着重描述了聚合酶链反应技术在具核梭形杆菌检测中的应用。

[关键词] 具核梭杆菌; 细菌检测; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 780.2 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.06.018

Research progress on biological characteristics and testing means of *Fusobacterium nucleatum* Guo Yang¹, Zhang Yujie², Xiao Shuiqing². (1. Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China; 2. Dept. of Orthodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, China)

[Abstract] *Fusobacterium nucleatum*, one of the main pathogens causing periodontitis, is detected extremely high in oral and even systemic infectious diseases, and closely related to the clinical anaerobic infections. It indicates significant virulence or pathogenicity through multiple mechanisms to interfere with host defense capabilities and further lead to periodontal destructions. This article describes some important characteristics of *Fusobacterium nucleatum*, including its biological characteristics, classification, toxicity characteristics, as well as the major biological detection methods, and focuses on the application of polymerase chain reaction technology in the detection of *Fusobacterium nucleatum*.

[Key words] *Fusobacterium nucleatum*; bacterial detection; polymerase chain reaction

具核梭杆菌属于革兰阴性专性厌氧菌, 参与牙周疾病的炎症反应, 常在龈下菌斑中分离到, 是在牙周病中起主导作用的微生物, 也是成人牙周炎和青少年牙周炎的可疑致病菌之一^[1]。该菌除可引起口腔疾病外, 还可引起身体其他部位的感染, 包括脑、肺和肝, 血液和关节, 胸和腹部^[2]。具核梭杆菌还是一种常见的宫内感染厌氧菌, 可在早产且留有完整胎膜的孕妇羊水中检测出^[3], 提示其可能在早产发病机制中起了重要的作用。具核梭杆菌作为主要的厌氧微生物在龈下菌斑中聚居, 其存在与繁殖引起了牙周组织中局部炎症的发生。本文就具核梭杆菌的一些重要特征及其感染的牙周组织的炎症反应机制, 主要的生物学检测手段作以下综述。

1 具核梭杆菌的主要生物学特性

1.1 定植与共聚

侵入是细菌致病并使其深入组织内部的一种重要方式。早期的组织学研究显示, 在牙周病患者牙周的深部组织中可以检测到梭状细菌。丁一等^[1]发现: 具核梭杆菌定植于牙周袋中部和深部区域的非附着菌斑中, 可通过这些非附着菌斑参与牙周炎的发生发展过程; 具核梭杆菌与上皮细胞相互作用, 有定植于口腔上皮细胞的潜力。具核梭杆菌作为梭杆菌属, 在牙周袋中存在着可利用的共聚特性, 拥有多种凝集蛋白, 可凝集人和绵羊的红细胞, 黏附于上皮细胞和羟磷灰石表面; 它既可与早期定植菌如放线菌共聚, 又可与晚期定植菌如牙龈卟啉单胞菌属、血链球菌、幽门螺杆菌和放线杆菌等共聚^[4]。

1.2 分型

Kim等^[5]根据 RNA 聚合酶亚基基因(*rpoB*)和

[收稿日期] 2012-03-08; [修回日期] 2012-07-13

[基金项目] 济南市科技攻关计划基金资助项目(200905034)

[作者简介] 郭杨(1986—), 女, 山东人, 硕士

[通讯作者] 肖水清, Tel: 13105316536

锌蛋白酶基因的核苷酸序列分析,利用分子标志物鉴定出口腔中具核梭杆菌的五种亚型为具核梭杆菌具核亚种、多形亚种、梭形亚种、文氏亚种和动物亚种。

1.3 致病性

1.3.1 代谢产物与致病性 具核梭杆菌是口腔致病菌群中为数不多的可以利用氨基酸分解代谢产物提供能量的无芽胞厌氧菌,它与大多数其他微生物一样,葡萄糖不是必需的,这些因素有助于其在口腔环境中生存和牙周疾病中的存在。丁酸是具核梭杆菌的主要代谢产物,可抑制人类牙龈成纤维细胞的增殖,可渗入牙龈上皮细胞并在牙菌斑中不断积聚^[3]。Tipton等^[6]在研究了脂多糖刺激细菌的单核巨噬细胞后发现,丁酸和脂多糖对外周血单个核细胞的增殖和程序性死亡有调节作用,丁酸抑制外周血单个核细胞的增殖反应呈剂量依赖性,且单独增加脂多糖不能使人外周血单个核细胞中的DNA片段化。该研究进一步证实,丁酸可通过诱导T细胞程序性死亡来调整牙周组织中免疫调节细胞的群体数量。

1.3.2 黏附性与致病性 细菌黏附作为一种主要的致病因素,通常是感染和侵袭宿主的第一步。Han等^[7]发现,具核梭杆菌具有明显的黏附性,可以结合从原核细胞到真核细胞的细胞外分子。在该研究中,一种新型的口腔具核梭杆菌唯一的黏附蛋白fadA结合的口腔黏膜的KB细胞表面蛋白,由129个氨基酸残基组成,其中包括18个氨基酸的信号肽,其相对分子质量分别为 1.36×10^4 的完整形式和 1.26×10^4 的分泌形式。具核梭杆菌侵入体外的上皮细胞和内皮细胞,其黏附与细菌的共聚密切相关。这种新型的黏附蛋白参与附着哺乳动物细胞的具核梭杆菌,其提取有助于进一步理解牙周病的发病机制。孙昌娟等^[8]在采用放射性核素闪烁计数法测定具核梭杆菌等四种牙周可疑致病菌对胶原包被的羟磷灰石试验膜的黏附能力时发现,不同的牙周可疑致病菌对胶原包被的羟磷灰石的选择性黏附作用不同,具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌对胶原有较强的亲和作用,在细菌的局部定植过程和牙周炎的进展和复发中可能发挥重要的作用。该实验结果提示,具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌之所以是龈下菌斑中的优势菌,不仅在于其存在一些毒力因子,还有可能在于其较强的黏附和介导黏附的能力,从而在龈下菌斑生物膜形成初期大量黏附于根面,使其数量

不断增加。

1.3.3 内毒素与致病性 内毒素系存在于革兰阴性细菌细胞壁外膜中的脂多糖成分,对维持细菌外膜的稳定性和通透性以及革兰阴性细菌的致病机制中发挥着重要的作用^[9]。具核梭杆菌产生的内毒素具有引起组织出血性坏死、抑制细胞生长等毒性作用,具核梭杆菌还可产生蛋白酶和硫酸脂酶以及一些有机酸等,造成牙周组织的破坏^[10]。苏勤等^[11]在用甲噻唑四唑氮、酶动力学方法和放射免疫技术研究具核梭杆菌的内毒素对重组人成骨蛋白-1诱导骨髓细胞增殖和分化的影响时发现,适度的内毒素在骨髓对龋病的防御反应过程中起着一定的调节作用。

具核梭杆菌既可刺激上皮细胞分泌白细胞介素-8,进而诱发宿主的炎症反应;还可刺激人外周血白细胞的程序性死亡和抑制T细胞反应^[7]。具核梭杆菌作为一种与牙周病以及身体其他各部位感染性疾病有密切联系的病原菌,可能具有诸多潜在的毒力机制。目前,具核梭杆菌的一些毒力表型已被鉴定;具核梭杆菌产生的多种毒力因子,例如外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)的fomA基因(具核梭杆菌表面主要的热修改蛋白)和radD基因以及fadA黏附蛋白、丝氨酸蛋白酶和聚-C型谷氨酸等,均可引起组织细胞破坏和机体免疫系统损伤;具核梭杆菌结合其自身的黏附性和共聚性发挥着黏附和定植宿主的特性^[12]。

2 具核梭杆菌的检测手段

随着分子微生物学和分子化学的飞速发展,细菌的分类鉴定已从表型特征的鉴定深化为基因特征的分类鉴定,牙周病病原微生物的检测手段也在不断的提高。当下,具核梭杆菌的检测主要有细菌培养与鉴定技术、核酸探针杂交技术、免疫组织化学技术和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术等^[13]。

2.1 细菌的培养与鉴定技术

细菌的培养与鉴定技术既是传统的微生物检测中最基本可靠的方法,也是微生物检查的金标准,其他的检测技术经常需要与其进行比较,所以其还在临床上广泛应用。符义富等^[14]在对具核梭杆菌进行的传统细菌培养检测中发现:具核梭杆菌为革兰阴性无芽胞梭形杆菌,呈边缘不齐的半透明菌落;触酶试验阴性、吲哚试验阳性和苏氨酸产丙酸盐试验阳性以及葡萄糖和果糖弱发酵

反应；其典型外观呈纺锤形，有锐利的尖端，偶尔中间膨胀。但是，由于厌氧菌分离培养的条件要求较高，时间较长，而且临床标本取量少，相关菌种多，所以临床采用的分离培养和鉴定方法常受到限制。

2.2 核酸探针杂交技术

核酸探针杂交技术的工作原理：DNA 单链分子或 RNA 单链分子按碱基互补配对原则在一定条件下构成稳定的双链结构，再通过示踪标志物探针检测病原菌。核酸探针杂交技术检测牙周细菌有许多优点：灵敏度高、特异性强以及高度广泛地识别病原微生物；而且不依赖培养，可以直接从标本中检测^[15]。DNA 探针技术检测具核梭杆菌较培养法有更高的检测效率，而且不需要厌氧培养的特殊设备，省时、省力、快速，可以排除厌氧菌不易存活的假阴性结果^[16]。Kim 等^[15]应用 DNA 探针 Fu12 和三对 PCR 引物鉴定了具核梭杆菌 ATCC25586T，重点识别了具核梭杆菌的真实性；但是，全基因探针可能与不同种的细菌存在着交叉反应，克隆的 DNA 探针可能与同源细菌之间发生交叉反应，导致厌氧菌检测的假阳性结果。例如，具核梭杆菌可能与大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌等发生交叉反应^[16]，而且任何一种方法不可能有 100% 的特异性和敏感性，所以必须考虑假阳性和假阴性的问题。目前，DNA 探针还不能完全取得常规检验提供的细菌特性信息。

2.3 免疫检测技术

用于厌氧菌培养的免疫检测技术主要是免疫荧光技术。免疫荧光技术是一种利用物质吸收光能后产生激发态而发光的特性，将具有这种特性的荧光素用化学方法结合在特异的抗体或抗原上，又不损害其抗体或抗原活性的荧光显微镜下的示踪技术，在临床免疫学中主要用于鉴定细菌和对抗原结构的研究。目前，免疫荧光和酶联免疫吸附测定被用于识别和量化龈下菌斑中存在的细菌。Suchett-Kaye 等^[17]使用细菌密度荧光免疫法和免疫荧光显微镜法成功地检测出伴放线嗜血菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和福赛斯拟杆菌等牙周病原菌，减少了交叉反应导致的假阳性结果，证明了免疫荧光显微镜法较其他免疫学检测法有明显的优势。

2.4 聚合酶链反应技术

PCR 是一种通过酶促反应在体外扩增特异 DNA 片段的技术，即利用 DNA 聚合酶，以单链

DNA 为模板和寡核苷酸为引物，沿模板以 5' 到 3' 方向延伸引物的过程，扩增产物可通过凝胶电泳或 DNA 探针杂交法作定性或半定量分析。在牙周细菌学检查方法中，PCR 技术以敏感、特异、简便和快速的特点成为世人瞩目的生物技术革命的新产物，已逐步应用于牙周病原菌的检测^[18]。传统的 PCR 技术、实时 PCR 技术和多重 PCR 技术等，已经成功地用于具核梭杆菌的基因及其致病因子等基因产物的临床与实验室检测。

2.4.1 PCR 技术 PCR 技术在牙周病原性厌氧菌诊断及其基因型分析中应用广泛，它对具核梭杆菌的检测非常精确，不仅快速、省力和价格便宜，而且有特异性。Suchett-Kaye 等^[17]发现：任意引物-PCR 技术已成功地应用于具核梭杆菌的检测，而且该技术在鉴别细菌遗传和表型相似性上是非常有价值的；此外，利用 PCR 技术在临床标本中设计快速检测生物特异性的 PCR 引物和 DNA 探针，使不能人工培养的菌种得以鉴定。在该研究中，PCR 技术的另一优点得以展现：在牙周病治疗中应用抗生素样抗性基因，监测并衡量抗生素治疗的效果，患者可避免随意使用抗生素。

Haake 等^[19]确定了具核梭杆菌相对分子质量为 4.0×10^4 的外膜蛋白基因(*fomA*)的序列，并用简并引物扩增出 *fomA* 基因 120 bp 的产物。*fomA* 是一种相对分子质量为 $(4.0 \sim 4.2) \times 10^4$ 的热稳定蛋白，参与宿主免疫细胞的刺激、入侵和吸附。它作为具核梭杆菌的主要 omp，表现出一般扩孔蛋白的功能特性，其成孔活性已在人工脂质双层膜上进行了研究；它作为一种受体蛋白，与其他口腔病原菌，如链球菌和牙龈卟啉菌共聚。在该研究中，*fomA* 基因的序列测序已确定了 PCR 扩增的 DNA 片段，使人们有可能设计出 PCR 检测具核梭杆菌 T18 *fomA* 基因的扩增引物。该研究采用 PCR、染色体 DNA 的提取、DNA 重组等多项技术发现，*fomA* 基因在大肠埃希菌中完整表达。Bolstad 等^[20]以 PCR 基因组 DNA 为模板，使用新的 DNA 片段引物，确定了具核梭杆菌 *omp-1* 基因的核苷酸序列，其中具核梭杆菌菌株 *omp-1* 蛋白的编码基因序列已被确定，*omp-1* 为相对分子质量为 4.0×10^4 的 *omp-1* 蛋白的完整基因序列。

另有研究^[21-23]显示：PCR 技术相对于传统培养法对厌氧菌具有高度特异性和敏感性，而且还大大简化了对临床标本的处理。

2.4.2 实时定量 PCR 技术 实时定量 PCR(quant-

titative real-time polymerase chain reaction, QRT-PCR) 是一种利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化, 通过 C_t 值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析的技术。相对于传统的培养技术, QRT-PCR 具有非常好的一致性; 不但弥补了传统 PCR 技术无法定量和容易污染等不足, 而且更具备了敏感性高和快捷的优势, 有着广阔的应用前景; 同时, 也使得从 mRNA 中克隆特异性 cDNA 片段变得非常的容易^[24]。Boutaga 等^[25]用 RT-PCR 技术检测具核梭杆菌等牙周致病菌后发现, QRT-PCR 技术对所有细菌能准确鉴别, 而且没有交叉反应, 与培养技术具有一致性, 但更敏感、更迅速。Jervøe-Storm 等^[26]用细菌培养和 RT-PCR 技术检测和定量比较龈下菌斑中的包括具核梭杆菌在内的五种细菌样本显示, RT-PCR 技术对具核梭杆菌的检测具有 98.4% 的敏感性以及 13.3% 的特异性。张明珠等^[27]分别用 QRT-PCR、激光共聚焦显微镜和流式细胞仪对口腔变异链球菌、牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌的标准菌种进行定量分析, 结果显示: QRT-PCR 分析和激光共聚焦显微镜观察结果优于传统的集落生成单位计数法, 其中尤以 QRT-PCR 分析的敏感度最高。

2.4.3 多重 PCR 技术 多重 PCR 技术是在一次反应中同时加入多对引物, 对同一份模板 DNA 样品中不同序列同时扩增, 由于每对引物对所扩增的产物片段长短不同, 因而通过电泳系统可给予区分, 所以多重 PCR 技术可同时检测多个病原菌。符义富等^[14]用 16S rDNA 序列分析技术检测牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌等五种牙周致病菌发现, 16S rDNA 序列分析具有检测率高、稳定性好、敏感度高和特异性高等特点。Keller 等^[28]利用带有特异性 16S rDNA 引物的多重 PCR 技术对具核梭杆菌进行检测, 敏感度非常高, 而且加入特异性的引物可同时检测多个病原菌。

3 结语

综上所述, 随着现代微生物学、免疫学和分子生物学等学科的发展, 牙周病病因的研究不断深入, 手段也不断更新, 例如激光共聚焦显微镜、计算机图像分析、免疫荧光、聚合酶链反应、核酸杂交和基因检测等现代生物学分析技术, 使对牙周微生物及其有意义抗原、遗传物质和毒力因子等的研究达到分子水平, 在牙周细菌分类、

分型或检测、评估牙周致病菌毒力因子、追踪病原体传播途径等方面有了许多进展。具核梭杆菌作为口腔感染部位的优势菌, 在与牙龈卟啉单胞菌、福赛斯拟杆菌、伴放线嗜血菌和变异链球菌等的混合感染中起协同作用, 而且与早发性牙周炎和急性坏死性牙龈炎以及各种严重牙周损害的破坏性牙周病密切相关^[29]; 因此, 该细菌的生物学检测在牙周炎的预防、诊断和临床治疗中有重要的意义。

4 参考文献

- [1] 丁一, 费晓露, 徐屹, 等. 具核梭杆菌黏附和侵入上皮细胞的初步研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(4): 200-203.
- [2] Signat B, Roques C, Poulet P, et al. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2011, 13(2): 25-36.
- [3] Roberts GL. Fusobacterial infections: An underestimated threat[J]. *Br J Biomed Sci*, 2000, 57(2): 156-162.
- [4] 谢立苹, 李中华, 邵世和. 具核梭杆菌的研究进展[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2003, 4(4): 319-321.
- [5] Kim HS, Lee DS, Chang YH, et al. Application of rpoB and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2): 545-553.
- [6] Tipton DA, Legan ZT, Dabbous MK. Methamphetamine cytotoxicity and effect on LPS-stimulated IL-1 β production by human monocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(3): 921-927.
- [7] Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesion unique to oral fusobacteria[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(15): 5330-5340.
- [8] 孙昌娟, 杨禾, 雷朝锋, 等. 牙周可疑致病菌对胶原包被羟磷灰石黏附的体外实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 6(3): 331-333.
- [9] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 425.
- [10] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(12): 3770-3783.
- [11] 苏勤, 何国华, 张郁, 等. 内毒素对重组人成骨蛋白-1 诱导人牙髓细胞活性的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 1999, 6(2): 116-118.
- [12] Lee HR, Rhyu IC, Kim HD, et al. *In vivo*-induced antigenic determinants of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2011, 26(2): 164-172.
- [13] Demling A, Demling C, Schweska-Polly R, et al. Influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status in adults[J]. *Eur J Orthod*, 2009, 31(6): 638-642.

- [14] 符义富, 傅尧, 李兵, 等. 用 16S rRNA 序列分析技术检测龈下菌斑中致病菌[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(1): 40-42.
- [15] Kim HS, Song SK, Yoo SY, et al. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586T[J]. J Microbiol, 2005, 43(4): 331-336.
- [16] Kuritza AP, Getty CE, Shaughnessy P, et al. DNA probes for identification of clinically important *Bacteroides* species[J]. J Clin Microbiol, 1986, 23(2): 343-349.
- [17] Suchett-Kaye G, Morrier JJ, Barsotti O. Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease[J]. Res Microbiol, 2001, 152(7): 631-639.
- [18] 钟晓波, 黄定明, 丁一. 聚合酶链反应在牙周病原微生物检测中的应用[J]. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(2): 110-112.
- [19] Haake SK, Wang X. Cloning and expression of FomA, the major outer-membrane protein gene from *Fusobacterium nucleatum* T18[J]. Arch Oral Biol, 1997, 42(1): 19-24.
- [20] Bolstad AI, Jensen HB. Complete sequence of omp1, the structural gene encoding the 40-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium nucleatum* strain Fev1[J]. Gene, 1993, 132(1): 107-112.
- [21] Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2362-2365.
- [22] Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR[J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(4): 211-215.
- [23] Verner C, Lemaitre P, Daniel A, et al. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(6): 341-346.
- [24] Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 45(2): 191-199.
- [25] Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens[J]. J Clin Periodontol, 2006, 33(6): 427-433.
- [26] Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, et al. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples[J]. J Clin Periodontol, 2005, 32(7): 778-783.
- [27] 张明珠, 李超伦, 姜云涛, 等. 口腔常见微生物不同定量分析方法的比较[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(2): 152-155.
- [28] Keller PM, Rampini SK, Bloemberg GV. Detection of a mixed infection in a culture-negative brain abscess by broad-spectrum bacterial 16S rRNA gene PCR[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2250-2252.
- [29] 闫福华, 郑瑜谦. 口腔螺旋菌与牙周炎[J]. 口腔医学研究, 2008, 24(2): 121-123.

(本文编辑 刘世平)

(上接第 769 页)

- view[J]. Eur J Oral Implantol, 2009, 2(4): 247-266.
- [22] Ninomiya M, Kamata N, Fujimoto R, et al. Application of enamel matrix derivative in autotransplantation of an impacted maxillary premolar: A case report[J]. J Periodontol, 2002, 73(3): 346-351.
- [23] Caglar E, Tanboga I, Süsal S. Treatment of avulsed teeth with Emdogain—a case report[J]. Dent Traumatol, 2005, 21(1): 51-53.
- [24] Barrett EJ, Kenny DJ, Tenenbaum HC, et al. Replantation of permanent incisors in children using Emdogain[J]. Dent Traumatol, 2005, 21(5): 269-275.
- [25] Craig RG, Kamer AR, Kallur SP, et al. Effects of periodontal cell grafts and enamel matrix proteins on the implant-connective tissue interface: A pilot study in the minipig[J]. J Oral Implantol, 2006, 32(5): 228-236.
- [26] Miron RJ, Oates CJ, Molenberg A, et al. The effect of enamel matrix proteins on the spreading, proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces[J]. Biomaterials, 2010, 31(3): 449-460.
- [27] Chen H, Clarkson BH, Sun K, et al. Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure[J]. J Colloid Interface Sci, 2005, 288(1): 97-103.
- [28] Nikolopoulos S, Peteinaki E, Castanas E. Immunologic effects of emdogain in humans: One-year results[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2002, 22(3): 269-277.
- [29] Hagenars S, Louwse PH, Timmerman MF, et al. Soft-tissue wound healing following periodontal surgery and Emdogain application[J]. J Clin Periodontol, 2004, 31(10): 850-856.

(本文编辑 刘世平)