

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.02.013

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.02.013>

高通量测序分析牙周基础治疗对 65 岁以上糖尿病合并慢性牙周炎患者龈下菌群的影响

牛家慧, 李创, 李蓉, 胡永权, 张江畔, 苑学微, 樊静珊, 张亚宏

(石家庄市第二医院口腔科, 石家庄 050051)

[摘要] 目的: 采用高通量测序技术分析牙周基础治疗对65岁以上糖尿病合并慢性牙周炎(diabetes mellitus with chronic periodontitis, DMCP)患者龈下菌群的影响。方法: 选取100例65岁以上DMCP患者作为研究对象, 采用随机数据表法将患者分为研究组与对照组, 每组50例。对照组给予强化控制血糖、基础疾病对症治疗、口腔卫生知识宣教等常规治疗, 研究组在此基础上给予牙周基础治疗, 治疗及复诊在4周内完成。比较2组患者的基线资料, 采用高通量测序技术比较2组患者治疗前、治疗后3个月时牙周龈下菌群中致病菌的相对含量。结果: 研究组与对照组分别有2例和5例患者失访, 最终分别纳入48例和45例患者。2组患者各项基线资料的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。2组患者治疗前牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量及牙周龈沟液中各种氧化还原物质水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。在治疗后3个月时, 2组患者牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量均较治疗前下降, 差异均有统计学意义($P>0.05$), 研究组牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量均低于对照组, 差异均有统计学意义($P>0.05$)。结论: 牙周基础治疗能够显著减少DMCP患者牙周龈下菌群中致病菌的含量, 纠正口腔菌群失调。

[关键词] 高通量测序; 牙周基础治疗; 糖尿病合并牙周炎; 龈下菌群; 氧化应激

Effect of periodontal basic treatment on subgingival microflora in patients over 65 years old with diabetes mellitus and chronic periodontitis by high throughput sequencing analysis

NIU Jiahui, LI Chuang, LI Rong, HU Yongquan, ZHANG Jiangpan, YUAN Xuewei, FAN Jingshan, ZHANG Yahong

(Department of Stomatology, Shijiazhuang Second Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract **Objective:** To analyze the effects of basic periodontal treatment on the subgingival microflora of patients over 65 years old with diabetes mellitus and chronic periodontitis (DMCP) by high throughput sequencing technology and to analyze the mechanism of oxidative stress. **Methods:** A total of 100 DMCP patients over 65 years old were

收稿日期 (Date of reception): 2021-07-14

通信作者 (Corresponding author): 胡永权, Email: huyongquan1963@126.com

基金项目 (Foundation item): 河北省重点研发计划 (192777101D)。This work was supported by the Key R&D Project of Hebei Province, China (192777101D).

selected as the research subjects and randomly divided into a study group and a control group, with 50 cases in each group. The patients in the control group were treated with the routine treatments, such as intensive blood glucose control, symptomatic treatment of basic diseases and oral health knowledge education while the patients in the study group were treated with periodontal basic treatment on this basis. The treatments and follow-up visit were completed within 4 weeks. The baseline data between the 2 groups were compared; the relative contents of periodontal subgingival bacteria before and at 3 months after the treatments between the 2 groups were compared by high-throughput sequencing technology. **Results:** Two patients in the study group and 5 patients in the control group were lost to follow-up, and finally 48 patients and 45 patients were included. There was no significant difference in baseline data between the 2 groups ($P>0.05$). There was no significant difference between the 2 groups in the relative contents of various pathogenic bacteria in the periodontal subgingival microflora and the levels of various oxidizing and reducing agents in the gingival crevicular fluid before treatment ($P>0.05$). Three months after the treatment, the relative contents of all kinds of pathogenic bacteria in periodontal subgingival flora of 2 groups were decreased compared with that before treatment, and the differences were statistically significant ($P>0.05$). The relative contents of all kinds of pathogenic bacteria in periodontal subgingival flora of the study group were lower than that of the control group, and the differences were statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion:** The application of periodontal basic treatment can significantly reduce the contents of pathogenic bacteria in periodontal subgingival microflora of the patients with DMCP, and correct the imbalance of oral microflora.

Keywords high throughput sequencing; periodontal basic therapy; diabetes mellitus with chronic periodontitis; subgingival microflora; oxidative stress

随着居民生活方式、饮食习惯的改变和人口老龄化趋势的加剧,我国老年2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者数量逐年增加,据统计^[1],我国目前老年人口数量约2.5亿,25%的65岁以上老年人患有T2DM,且这一人群的糖尿病前期比例可能高达50%^[2]。65岁以上的T2DM人群与其他年龄段人群在并发症种类和病情进展方面可能存在显著差异,提升对65岁以上老年T2DM患者的预防和诊治工作水平已成为我国的重大公共卫生课题^[3]。慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)是T2DM的重要并发症和共患疾病,T2DM患者伴发重度CP的风险可提升2~3倍^[4],而CP又会影响患者的糖代谢状态,针对糖尿病合并慢性牙周炎(diabetes mellitus with chronic periodontitis, DMCP)的治疗是一项棘手的临床难题,至今尚未形成规范化的标准治疗指南。牙周基础治疗是预防和治疗CP的关键手段,目前的循证医学证据^[5]显示:牙周基础治疗有利于DMCP患者总体血糖水平的控制,但对于牙周龈下菌群及微环境的影响尚不明确。学术界普遍^[6-7]认为:DMCP的发生、发展机制为T2DM患者糖代谢异常改变全身和牙周微环境,最终影响牙周局部菌斑微生物定植和牙周骨代谢,免疫紊乱、炎症反应、内质网应激、线粒体凋亡、成骨-破骨偶联失衡等多重机制可能均参与其病理过

程^[8]。基于此,本研究采用随机对照的方法和高通量测序分析牙周基础治疗对65岁以上DMCP患者龈下菌群的影响进行初步探讨,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2019年6月至2020年6月在石家庄市第二医院口腔科及内分泌科门诊就诊的100例DMCP患者作为研究对象,采用随机数据表法将患者分为研究组与对照组,每组50例,2组患者均自愿参与本研究,并签署知情同意书,本研究方案符合《赫尔辛基宣言》要求,经石家庄市第二医院医学伦理委员会审核批准。

纳入标准:T2DM的诊断依据《糖尿病医学诊疗标准(2019年版)》^[9],CP的诊断依据欧洲牙周病联合会与美国牙周病学会于2018年召开的牙周病和植体牙周病新分类国际研讨会提出的共识标准^[10],临床资料完整,年龄均大于65岁。

排除标准:合并恶性肿瘤、心脑血管意外、未经有效控制的高血压、血液系统疾病、免疫缺陷症的患者;具有牙周外伤史、手术史或全口牙列缺失的患者;入组6个月内有大量应用激素、抗生素史的患者;既往接受过牙周治疗的患者;妊

妊娠期或哺乳期患者。

1.2 方法

对照组给予膳食指导、增加运动、口服降糖药物或注射胰岛素强化控制血糖,对血脂代谢异常、高血压等进行对症治疗,同时,向患者宣教口腔卫生知识、指导患者坚持正确刷牙。研究组在上述疗法的基础上给予牙周基础治疗,由口腔医师对患者进行牙周检查后给予牙周治疗,术前给予西吡氯铵含漱3 min,治疗内容主要为龈上洁治、龈下刮治和根面平整,主要是去除菌斑和牙石、调整咬合、纠正垂直食物嵌塞等,术毕局部应用米诺四环素软膏,采用双氧水和生理盐水对牙周袋和牙龈进行冲洗,术后给予口服甲硝唑治疗,所有治疗均在3周内完成,术后1周复诊对残余牙石进行再次清理,直至龈上无肉眼可见的牙石和色素,龈下探诊根面光滑平整、无残余牙石。

1.3 观察指标

1.3.1 基线资料

通过查阅门诊或住院病历对2组患者年龄、性别、合并基础疾病、吸烟史、牙周炎程度及入组时的空腹血糖、餐后2 h血糖、糖化血红蛋白水平等基线资料进行比较。

1.3.2 牙周龈下菌群相对含量

1)标本采集。于入组时和治疗后3个月采集2组患者的菌斑样本,确保2次采集位点一致,采集方法为将患者口腔分为6个区段,均于探诊深度最深位点采集龈下菌斑,采集时要去除龈上菌斑后以刮治器采集龈下菌斑,将所有区段采集位点的菌斑样本集合置于有缓冲液的EP管,以无菌液体石蜡隔绝空气,置于-80℃冰箱中保存待测。

2)实验检测。①提取DNA:采用DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司生产]提取菌斑样本的基因组DNA,以紫外分光光度计对DNA的纯度和浓度进行检测,将得到的gDNA放置于-20℃保存。②建库及测序:首先取10 ng gDNA进行起始建库,采用Covaris M220自动聚焦声波基因组剪切仪进行片段化,选用1.8×DNA纯化磁珠进行纯化,并采用通用DNA文库构建试剂盒进行文库构建。采用16s-rDNA引物对菌群DNA进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增检测,检测仪器为MiSeq高通量测序仪(美国Lumina公司生产)和实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司生产),反应体系为20 μL,引物序列见表1,反应条件为95℃ 3 min,退火延伸95℃ 30 s, 55℃ 30 s,

72℃ 45 s,共反应27个循环,72℃延伸10 min。PCR扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳分离不同菌群DNA条带并计算菌群相对含量。③数据处理:采用Fast QC进行数据质量评估,应用Trimmomatic选择过滤标准,将低质量碱基、接头等去除。参考数据库对数据进行快速比对归类,以相似性将其分成不同小组。利用贝叶斯算法分析序列。使用Usearch软件平台与Silva进行对比。依次统计样本中各物种在各个分类的序列数,并与样品总序列数进行对比,得出相对丰度。考虑到龈下菌群种类繁多且构成复杂,参考相关文献中报道的DMCP常见龈下菌群种类,本研究选取牙龈卟啉单胞菌、伴放线菌嗜血菌、福赛斯坦纳菌、中间普雷沃菌、齿垢密螺旋体作为待测菌种。

表1 16s-rDNA引物序列

Table 1 Primer sequence of 16S rDNA

引物名称	引物序列(5'-3')
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

1.4 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,服从正态分布的连续计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组比较采用独立样本t检验,同组治疗前、后的比较采用配对t检验;计数资料以例数(%)表示,样本率或构成比的比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者基线资料的比较

研究组与对照组分别有2例和5例患者失访,最终分别纳入48例和45例患者。2组患者的各项基线资料的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$,表2)。

2.2 2组患者治疗前、后牙周龈下菌群相对含量的比较

2组患者治疗前牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量的差异无统计学意义($P > 0.05$),在治疗后3个月,2组患者牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量均较治疗前下降,差异均有统计学意义

($P < 0.05$), 研究组牙周龈下菌群中各类病原菌相对含量均低于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$, 表3)。

2.3 2 组治疗后血糖指标的比较

研究组治疗后的血糖指标均优于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$, 表4)。

表2 2组患者基线资料的比较

Table 2 Comparison of the baseline data between the 2 groups

基线资料	研究组(n=48)	对照组(n=45)	统计值	P
年龄/岁	69.62 ± 4.19	69.18 ± 4.52	0.487	0.519
性别/例			0.200	0.654
男	32	28		
女	16	17		
高脂血症/例	26	29	1.015	0.314
高血压/例	19	15	0.391	0.532
冠心病/例	12	10	0.099	0.753
牙周炎病情/例			0.854	0.355
轻度	21	24		
中度以上	27	21		
空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)	10.64 ± 3.32	10.96 ± 3.53	-0.451	0.523
餐后2 h血糖/(mmol·L ⁻¹)	13.82 ± 2.76	13.48 ± 2.91	0.578	0.425
糖化血红蛋白/%	9.75 ± 2.24	9.77 ± 2.46	-0.041	0.961

表3 2组患者治疗前、后牙周龈下菌群相对含量的比较

Table 3 Comparison of the relative content of periodontal subgingival flora before and after the treatment between the 2 groups

组别	n	牙龈卟啉单胞菌	伴放线菌嗜血菌	福赛斯坦纳菌	中间普雷沃菌	齿垢密螺旋体
治疗前						
研究组	48	359.12 ± 58.44	291.16 ± 35.48	364.12 ± 42.56	251.31 ± 29.92	309.18 ± 40.96
对照组	45	356.36 ± 55.02	293.42 ± 29.47	367.68 ± 41.85	247.39 ± 32.05	312.14 ± 43.58
t		0.234	-0.333	-0.406	0.610	-0.338
P		0.765	0.669	0.598	0.385	0.667
治疗后3个月						
研究组	48	152.14 ± 27.58	129.82 ± 19.87	128.38 ± 20.23	124.45 ± 17.35	137.74 ± 24.68
对照组	45	203.48 ± 58.75	201.56 ± 25.43	194.43 ± 28.07	191.40 ± 18.87	219.72 ± 30.03
t		-5.449	-15.211	-13.079	-17.825	-14.421
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 2组治疗后血糖指标的比较

Table 4 Comparison of the blood glucose indexes after the treatment between the 2 groups

组别	n	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)	餐后2 h血糖/(mmol·L ⁻¹)	糖化血红蛋白/%
研究组	48	7.52 ± 1.03	9.84 ± 1.26	7.72 ± 0.84
对照组	45	8.79 ± 1.53	11.81 ± 2.25	9.05 ± 1.85
t		-4.722	-5.252	-4.511
P		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

本研究结果显示：牙周基础治疗能够显著地降低DMCP患者牙周龈下菌斑内有害病原菌的相对含量，从而改善牙周局部的微生物环境。目前，学术界针对CP的病因学说趋向于菌群失调学说，即认为CP的发生不是特定病原菌作用的结果，而是由于口腔局部菌群失调和产毒能力提升导致了免疫细胞浸润、细胞因子活化和组织破坏，最终导致了CP的发生^[11-12]，而糖尿病能够通过影响细菌的离子转运、物质合成代谢等诱发口腔菌群的失调并使其毒力增强^[13]。临床研究^[14]发现：DMCP患者龈下菌群中致病菌含量明显增多，因此，改善牙周局部菌群环境是治疗DMCP的关键环节。在临床治疗中，对于DMCP患者均要给予强化控制血糖水平等常规治疗，主要原因为DMCP患者的牙周病变程度及龈下菌群分布变化与其血糖控制水平密切相关，良好的血糖控制对于维持患者龈下菌群稳态、治疗牙周病具有积极的作用，而当患者因血糖控制不佳引起酮症酸中毒等并发症时，口腔致病菌的侵袭和定植能力也会大幅度增强^[14]。然而，单一的强化血糖控制和加强口腔清洁并不能在DMCP的治疗中取得满意的效果，于是，学术界开始探讨牙周治疗在改善DMCP患者口腔菌群方面的作用。虽然近年来出现了多种针对DMCP的新型牙周治疗方法，但其临床应用的可靠性未能得到充分证实，牙周基础治疗仍然是针对DMCP患者的主要治疗方法。

本研究结果显示：未给予牙周基础治疗的患者通过调整饮食结构、改变生活方式、强化控制血糖等常规治疗，也能够一定程度上达到减少龈下致病菌群、纠正氧化还原紊乱的效果，这反映了DMCP患者的牙周病变与血糖代谢紊乱具有密切的相关性，强化对血糖的控制对于DMCP的治疗具有重要的意义。

综上，牙周基础治疗能够显著减少DMCP患

者牙周龈下菌群中致病菌的含量，纠正口腔菌群失调。

参考文献

- Juan J, Yang H. Prevalence, prevention, and lifestyle intervention of gestational diabetes mellitus in China[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(24): 9517.
- Xu S, Wu Y, Li J, et al. Evaluation of the value of diabetes risk scores in screening for undiagnosed diabetes and prediabetes: a community-based study in southwestern China[J]. *Postgrad Med*, 2020, 132(8): 737-745.
- 姜雪, 刘瑾文, 孙文霞, 等. 老年糖尿病患者健康素养影响因素的研究进展[J]. *延边大学医学学报*, 2020, 43(1): 61-64.
JIANG Xue, LIU Jinwen, SUN Wenxia, et al. Research progress on influencing factors of health literacy in elderly diabetic patients[J]. *Journal of Medical Science Yanbian University*, 2020, 43(1): 61-64.
- Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus[J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20(1): 204.
- 杜军, 王毅, 张勤. 糖尿病伴牙周炎患者全唾液中牙周致病菌的检测及其临床意义[J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(2): 148-152.
DU Jun, WANG Yi, ZHANG Qin. Detection of periodontal pathogens in whole saliva of diabetic patients with periodontitis and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2016, 24(2): 148-152.
- 宋文静, 葛少华. II型糖尿病牙周炎及牙周基础治疗对其影响的现状研究[J]. *口腔医学*, 2018, 38(9): 839-843.
SONG Wenjing, GE Shaohua. Current status of periodontal disease and periodontal therapy in type 2 diabetes mellitus[J]. *Stomatology*, 2018, 38(9): 839-843.
- 王冰格, 农晓琳. 糖尿病通过影响成-破骨细胞活性加重牙周炎病理进程的研究进展[J]. *实用口腔医学杂志*, 2020, 35(3): 526-529.
WANG Bingge, NONG Xiaolin. Progress in the study of diabetes affecting the pathophysiology of periodontitis by affecting osteoclast activity[J]. *Journal of Practical Stomatology*, 2020, 35(3): 526-529.

8. 何树荣, 赵维良. 高原地区糖尿病下肢动脉血管病变患者的血清氧化应激及炎症因子水平变化[J]. 川北医学院学报, 2019, 45(6): 787-790.
HE Shurong, ZHAO Weiliang. Changes of serum oxidative stress and inflammatory factors in patients with diabetic lower extremity arterial disease in plateau area[J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2019, 45(6): 787-790.
9. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019[J]. Diabetes Care, 2019, 42 (Suppl 1): S13-S28.
10. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification[J]. J Clin Periodontol, 2018, 45 (Suppl 20): S1-S8.
11. Borsanelli AC, Ramos TN, Gaetti-Jardim E Jr, et al. Treponema species in the subgingival microflora of ovine periodontitis[J]. Vet Rec, 2017, 180(6): 150.
12. Laleman I, Koop R, Teughels W, et al. Influence of tongue brushing and scraping on the oral microflora of periodontitis patients[J]. J Periodontol, 2018, 53(1): 73-79.
13. 郭馨蔚, 赵洪岩, 杨瑶瑶, 等. 牙周炎菌群失调研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(11): 739-744.
GUO Xinwei, ZHAO Hongyan, YANG Yaoyao, et al. Research progress on bacterial flora imbalance in periodontitis[J]. Journal of Dental Prevention & Treatment, 2019, 27(11): 739-744.
14. 张玲, 胡济安, 孙启俊, 等. 牙周炎伴糖尿病患者HbA1c差异性分析及其与口腔龈下菌群分布的关系[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(12): 1404-1408.
ZHANG Ling, HU Ji'an, SUN Qijun, et al. The difference of HbA1c in periodontitis with diabetes mellitus and its relationship with the distribution of subgingival flora[J]. Chinese Journal of Microecology, 2020, 32(12): 1404-1408.

本文引用: 牛家慧, 李创, 李蓉, 胡永权, 张江畔, 苑学微, 樊静珊, 张亚宏. 高通量测序分析牙周基础治疗对65岁以上糖尿病合并慢性牙周炎患者龈下菌群的影响[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(2): 346-351. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.02.013

Cite this article as: NIU Jiahui, LI Chuang, LI Rong, HU Yongquan, ZHANG Jiangpan, YUAN Xuwei, FAN Jingshan, ZHANG Yahong. Effect of periodontal basic treatment on subgingival microflora in patients over 65 years old with diabetes mellitus and chronic periodontitis by high throughput sequencing analysis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(2): 346-351. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.02.013