

# PCR-DGGE 技术应用于手足口病儿童口腔微生物菌群变化的初步研究

施春梅, 周 嫣, 方邦骞, 欧晓丽, 谢庆玲, 钟秀芬

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018252)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院口腔科

作者简介: 施春梅(1973-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 儿童口腔常见疾病的防治。E-mail: shi1973@163.com

**[摘要]** 目的 应用 PCR-DGGE 技术对手足口病(HFMD)、疱疹性口腔炎(HGS)及正常儿童口腔微生物菌群变化进行初步分析, 以期了解三者是否存在差异。方法 按随机数字表法选择 3 例手足口病唾液样本, 1 例幼儿园正常儿童唾液以及 1 例疱疹性口腔炎患儿唾液。样本进行微生物群落总 DNA 的抽提; 以此为模板扩增 16S rRNA V3 可变区, 产物经 DGGE 指纹图谱分析其组成结构, 并运用 UVIBAND/MAP 等软件比较所得群落指纹图谱的相似性指数; 对 DGGE 指纹图谱上的泳带中优势条带切胶测序, 进行基因序列分析, 得出该样本的优势菌群。结果 手足口病组优势菌群: Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌、Selenomonas 月形单胞菌属、Prevotella 普氏菌属、TM7\_genera\_incertae\_sedis 菌属、Streptococcus 链球菌属、Neisseria 奈瑟菌属、Porphyromonas 卟啉单胞菌属、Campylobacter 弯曲菌属、Campylobacter 弯曲菌属、Granulicatella 菌属、Leptotrichia 纤毛菌属、Veillonella 韦永氏球菌属、Bacteroides-like sp 菌属、Actinomyces 放线菌、Fusobacterium 梭菌属。正常对照组优势菌群: Veillonella 韦永氏球菌属、Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌、Prevotella 普氏菌、Gemella 双胎溶血菌属、Porphyromonas 卟啉单胞菌属、Ruminococcaceae 瘤胃球菌属、Lachnospiraceae 毛螺菌属、Selenomonas 月形单胞菌属、Clostridium 梭状芽孢杆菌、Haemophilus 嗜血杆菌。疱疹性口腔炎组优势菌群: Lactococcus 乳球菌属、Prevotella 普氏菌属。结论 手足口病组菌群结构更为复杂, 与疱疹性口腔炎组相比菌群结构差异明显。

**[关键词]** PCR-DGGE 技术; 手足口病; 疱疹性口腔炎

**[中图分类号]** R 788 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)02-0097-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.02.01

**A preliminary application of PCR-DGGE technology to research the changes of oral microbial floras in children with hand foot and mouth disease** SHI Chun-mei, ZHOU Yan, FANG Bang-qian, et al. Department of Dentistry, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To apply PCR-DGGE technology analysing changes of oral microbial floras in children with hand foot and mouth disease(HFMD). **Methods** According to the random number table method, 3 children with HFMD were randomly chosen and their saliva samples were collected; at the same time, saliva samples were collected from one normal child, and from one child with herpetic gingivostomatitis(HGS). Samples' total DNA extraction of the microbial community were performed; taking it as template for amplification of 16 s rRNA V3 variable area, the structure of product by the DGGE fingerprint, and using UVIBAND/MAP software for comparing similarity index of the community fingerprint; the edge banding on swimming belt of DGGE fingerprint were excised from the gel for sequencing, gene sequence analysis was performed, then the sample advantage bacterium group was obtained. **Results** The advantage bacterial colonies of HFMD group: Capnocytophaga, Selenomonas, Prevotella, TM7\_genera\_incertae\_sedis, Streptococcus, Neisseria, Porphyromonas, Campylobacter, Campylobacter, Granulicatella, Leptotrichia, Veillonella, Bacteroides-like sp, Actinomyces, Fusobacterium. The advantage bacterial colonies of normal group: Veillonella, Capnocytophaga, Prevotella, Gemella, Porphyromonas, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Selenomonas, Clostridium, Haemophilus. The advantage bacterial colonies of HGS group: Lactococcus, Prevotella. **Conclusion**

The flora structure of HFMD group was more complex, and there was obvious difference in the flora structure between HFMD group and HGS group.

**[Key words]** Polymerase chain reation-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE); Hand, foot and mouth disease (HFMD); Herpetic ginggivostomatitis (HGS)

口腔中大约寄居着 500 多种细菌。在一定条件下,这些细菌及其产物会导致一系列诸如冠心病等全身疾病的发生。传统的基于培养的方法可以部分反映菌群结构变化。然而,大量的口腔细菌是很难培养或不可培养的。近年来,聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reation-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 等基因指纹图谱技术,被广泛运用于分析临床或环境样品细菌群落结构的研究中。DGGE 具有检测极限低、易操作、可重复性强等特点,并可切胶回收其条带进行序列分析,从而可以鉴定细菌组成,研究种群结构。手足口病 (hand-foot-mouth disease, HFMD) 是由多种肠道病毒引起的常见传染病,而口腔病变是患儿最难以忍受的症状。疱疹性口腔炎 (herpetic ginggivostomatitis, HGS) 又名溃疡性口腔炎,其口腔病变症状与 HFMD 相似,两者同为病毒感染,但病毒类型不同。本研究利用小样本初步应用 PCR-DGGE 技术对两种疾病及正常儿童进行口腔微生物内环境比较,以期了解三者是否存在差异,为今后大样本量研究打下基础。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** HFMD 组:根据我国卫生部颁布的《手足口病预防控制指南》(2010 版)手足口病临床诊断标准,选 2011-01 ~ 2012-01 在广西壮族自治区人民医院儿科手足口病门诊及广西隆安县人民医院儿科就诊并确诊为手足口病的患儿 42 例,患儿监护人签署知情同意书。在 42 例患儿中按随机数字表法选择 3 例唾液样本。正常儿童组:广西教育厅幼儿园小班(3 岁左右)儿童 40 名,随机选择 1 例唾液样本。HGS 组:广西壮族自治区人民医院口腔科门诊就诊临床确诊为 HGS 的患儿 35 例,随机选择 1 例唾液样本。本研究成本昂贵,实验操作繁琐,故选择小样本进行初步探索。

**1.2 诊断标准** HFMD 临床诊断标准<sup>[1]</sup>:急性起病,发热,手掌或脚掌部出现斑丘疹和疱疹,臀部或膝盖也可出现皮疹。皮疹周围有炎性红晕,疱内液体较少;口腔黏膜出现散在的疱疹,疼痛明显。部分患儿可伴有咳嗽、流涕、食欲不振、恶心、呕吐和头疼等症状。HGS 临床诊断标准<sup>[2]</sup>:口腔黏膜任何部位均可受累,以邻近乳磨牙的上腭和龈缘处最明显,主

要表现为成簇小水疱,易破,形成大面积糜烂面。

**1.3 条件控制** HFMD 及 HGS 患儿取样时间在病程中期(发病第 4 ~ 5 天),取样前 1 周内未服用任何抗生素及免疫抑制剂。对照组入选对象 5 岁以下,口腔健康,无龋齿、牙周病及其他口腔或全身性疾病,口腔的龈炎指数、菌斑指数和出血指数均在正常范围,近 3 个月未用抗生素及免疫抑制剂。

**1.4 标本采集** 因研究对象年龄均在 3 岁以下,配合度较差,菌斑获取困难,本研究均采用唾液作为研究标本。采集方法:盐水含漱后,唾液吐入无菌痰液收集盒,用 5 ml 无菌注射器抽取放入 1 ml 离心管内,置于冰浴下转送 -20 ℃ 冰箱内贮存。

**1.5 样本细菌基因组的提取** 用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, -20 ℃ 保存。

## 1.6 DGGE 电泳及测序

**1.6.1 主要仪器** PCR 反应扩增仪 (BIO-RAD); SW-CJ-1D 洁净工作台 (江苏苏洁净化设备厂); DK-8D 型电热恒温水槽 (太仓市科教器材厂); DYY-8 型稳压稳流电泳仪 (北京六一); YXJ-2 离心机 (BBI); H6-1 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂); 凝胶成像系统 (上海山富); 移液器 (范围 100 ~ 1 000 ml, 20 ~ 200 ml, 0.5 ~ 10 ml) (加拿大 BBI 公司); 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.6.2 实验步骤

**1.6.2.1 16S rRNA gene V3 区扩增** 所用引物为细菌 16SrDNA V3 高变区 F338 和 R534 (见表 1), 反应体系为 50 μl 总体积, ddH<sub>2</sub>O 41.25 μl, 10 × Buffer (含 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>) 5 μl, dNTP (10 mM) 1 μl, F357-GC (10 μM) 1 μl, R518 (10 μM) 1 μl, Taq 酶 (5 U/μl) 0.25 μl, 模板 DNA 0.5 μl。反应程序: 94 ℃ 4 min 预变性; 94 ℃ 0.5 min; 56 ℃ 1 min; 72 ℃ 0.5 min; 30 Cycles, 72 ℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物各 3 μl, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 1 × TAE 缓冲液, 120 V 稳压电泳 30 min, 成像仪拍照 (见图 1)。

表 1 16S rRNA gene V3 区扩增 PCR 引物

| 引物      | 序列                                                                     | 扩增片段大小    |
|---------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| F338-GC | 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCG-<br>CCGCGCGCCCGCCCGCCCGCCG-<br>GAGCCAGCAG-3' | 230 bp 左右 |
| R534    | 5'-GT ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'                                        |           |

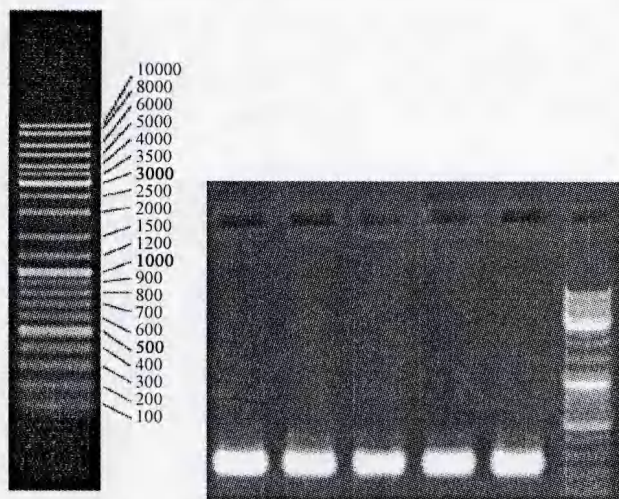
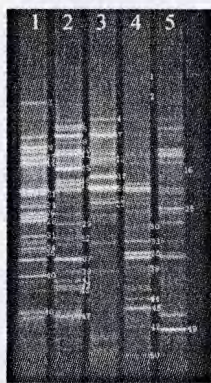


图 1 16S rRNA gene V3 区 PCR 扩增结果

1.6.2.2 变性梯度凝胶电泳 DGGE 取样品各 400 ng 的 V3 区 PCR 产物,采用 D-Code 突变检测系统对样品进行 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙稀酰胺:双丙稀酰胺 = 37.5:1),变性剂浓度从 30% ~ 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素, 40% 甲酰胺)。在 60 V 电压下,60 °C 恒温,1 × TAE 中电泳 16.0 h。电泳完毕后,用超纯水冲洗胶,然后将胶放进含 EB 的染液中,置于摇床上染色 30 min 后,在 UVI 成像系统拍照 (见图 2)。



第 1 样本为对照组正常儿童;第 2、3、4 样本为手足口病;第 5 样本为疱疹性口腔炎

图 2 变性梯度凝胶电泳结果

1.6.2.3 DGGE 条带回收 选取较有代表性的条带,用洁净的手术刀片将目标 DGGE 条带完整地切下并装入 1.5 ml 离心管中,按公司 SK8131 试剂盒方法回收,备用。

1.6.2.4 PCR 扩增及产物回收 PCR 反应体系与程序同上 (见表 2)。22 条带 PCR 电泳照 PCR 产物按公司 SK8131 试剂盒方法胶回收。

表 2 PCR 扩增引物

| 引物   | 序列                               | 扩增片段大小    |
|------|----------------------------------|-----------|
| F338 | 5'-ACT CC TAC GGG AGG CAG CAG-3' | 190 bp 左右 |
| R534 | 5'-GT ATT ACC GCG GCT GCT GC-3'  |           |

1.6.2.5 目的片段 TA 克隆连接 按 Takara pMD® 18-T Vector 连接试剂盒操作。(1)感受态细胞的制备 (氯化钙法):从 37 °C 培养 16 h 的新鲜平板中挑取一个单菌落,转到一个含有 100 ml LB 培养基的 1 L 烧瓶中。于 37 °C 剧烈振荡培养 3 h (旋转摇床, 300 r/min)。在无菌条件下将细菌转移到一个无菌、一次性使用、用冰预冷的 50 ml 聚丙烯管中,在冰上放置 10 min,使培养物冷却至 0 °C。于 4 °C 以 4 000 r/min 离心 10 min,回收细胞。倒出培养液,将管倒置 1 min,使最后残留的痕量培养液流尽。以 10 ml 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 重悬每份沉淀,放置于冰浴上。于 4 °C 以 4 000 r/min 离心 10 min,回收细胞。倒出培养液,将管倒置 1 min,使最后残留的痕量培养液流尽。每 50 ml 初始培养物以 2 ml 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub> (含 20% 甘油)重悬每份细胞沉淀。将细胞分装成小份 (100 μl/支),放于 -70 °C 冻存。(2)连接产物转化:取 100 μl 感受态细胞,置于冰上,完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮。加入 10 μl 连接液,轻轻混匀。冰上放置 30 min。42 °C 水浴热激 90 s。冰上放置 15 ~ 20 min。加 400 μl LB 培养基,37 °C 200 ~ 250 rpm 振荡培养 1 h。用枪头吸取 200 μl 培养菌液,涂布在预先用 20 μl 100 mM IPTG 和 100 μl 20 mg/ml X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上。平板在 37 °C 下正向放置 1 h 以吸收过多的液体,然后倒置培养过夜。(3)蓝白斑筛选:当外源 DNA 片段插入到 pUC57 中后,由于外源 DNA 的核酸序列存在改变了 LacZ 基因的编码,从而影响了其产物半乳糖苷酶片段的活性,因此重组克隆在 X-gal/IPTG 平板上呈现为白色,而非重组克隆呈蓝色,选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落。(4)质粒提取与测序:用 M13 + - 引物扩增 (体系如上),切胶回收行 M13 + - 引物测序。

## 2 结果

2.1 HFMD 组优势菌群 Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌、Selenomonas 月形单胞菌属、Prevotella 普氏菌属、TM7\_genera\_incertae\_sedis 菌属、Streptococcus 链球菌属、Neisseria 奈瑟菌属、Porphyromonas 卟啉单胞菌属、Campylobacter 弯曲菌属、Campyloba-

cter 弯曲菌属、Granulicatella 菌属、Leptotrichia 纤毛菌属、Veillonella 韦永氏球菌属、Bacteroides-like sp 菌属、Actinomyces 放线菌、Fusobacterium 梭菌属。

2.2 正常对照组优势菌群 Veillonella 韦永氏球菌属、Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌、Prevotella 普氏菌、Gemella 双胎溶血菌属、Porphyromonas 卟啉单胞菌属、Ruminococcaceae 瘤胃球菌属、Lachnospiraceae 毛螺菌属、Selenomonas 月形单胞菌属、Clostridium 梭状芽孢杆菌、Haemophilus 嗜血杆菌。

2.3 HGS 组优势菌群 Lactococcus 乳球菌属、Prevotella 普氏菌属。

2.4 菌种鉴定结果、序列分析结果及菌群种类构成情况 分别见表 3~5。

表 3 DGGE 中 41 条条带菌种鉴定结果

| 条带编号 | 克隆编号                 | V3 区   | 菌种属名                                |
|------|----------------------|--------|-------------------------------------|
| 1    | >11.29XDG137-1-M13-  | 174 bp | TM7_genera_incertae_sedis           |
| 3    | >11.29XDG137-3-M13-  | 199 bp | uncultured Gemella sp               |
| 4    | >11.29XDG137-4-M13-  | 194 bp | Capnocytophaga ochracea             |
| 5    | >11.29XDG137-5-M13-  | 174 bp | TM7_genera_incertae_sedis           |
| 7    | >11.29XDG137-7-M13-  | 194 bp | Capnocytophaga sp                   |
| 9    | >11.29XDG137-9-M13-  | 194 bp | Prevotella pallens                  |
| 10   | >11.29XDG137-10-M13- | 175 bp | Campylobacter gracilis              |
| 11   | >12.2XDG137-11-M13-  | 175 bp | TM7_genera_incertae_sedis           |
| 12   | >11.29XDG137-12-M13- | 195 bp | Porphyromonas                       |
| 13   | >11.29XDG137-13-M13- | 199 bp | Granulicatella adiacens             |
| 14   | >11.29XDG137-14-M13- | 172 bp | unclassified_Ruminococcaceae        |
| 15   | >11.29XDG137-15-M13- | 194 bp | Prevotella veroralis;               |
| 17   | >11.29XDG137-17-M13- | 198 bp | Streptococcus                       |
| 18   | >11.29XDG137-18-M13- | 194 bp | Porphyromonas                       |
| 19   | >11.29XDG137-19-M13- | 200 bp | uncultured Neisseria sp             |
| 20   | >11.29XDG137-20-M13- | 194 bp | Capnocytophaga sp                   |
| 23   | >11.29XDG137-23-M13- | 194 bp | Capnocytophaga leadbetteri          |
| 24   | >12.3XDG137-24-M13-  | 174 bp | Lachnospiraceae genomosp            |
| 25   | >11.29XDG137-25-M13- | 200 bp | Lactococcus lactis;                 |
| 26   | >11.29XDG137-26-M13- | 199 bp | Selenomonas infelix                 |
| 27   | >11.29XDG137-27-M13- | 174 bp | Clostridium saccharolyticum         |
| 28   | >11.29XDG137-28-M13- | 195 bp | Capnocytophaga leadbetteri          |
| 29   | >12.5XDG137-29-M13-  | 200 bp | uncultured Selenomonas sp           |
| 30   | >11.29XDG137-30-M13- | 177 bp | Leptotrichia genomosp               |
| 31   | >12.3XDG137-31-M13-  | 194 bp | Capnocytophaga leadbetteri          |
| 33   | >11.29XDG137-33-M13- | 194 bp | Prevotella saccharolytica           |
| 34   | >11.29XDG137-34-M13- | 199 bp | Haemophilus segnis                  |
| 35   | >11.29XDG137-35-M13- | 200 bp | Veillonella sp                      |
| 36   | >11.29XDG137-36-M13- | 200 bp | Veillonella parvula                 |
| 37   | >11.29XDG137-37-M13- | 194 bp | Capnocytophaga                      |
| 40   | >11.29XDG137-40-M13- | 200 bp | Veillonella atypic                  |
| 41   | >11.29XDG137-41-M13- | 195 bp | Uncultured Prevotellaceae bacterium |
| 42   | >12.3XDG137-42-M13-  | 199 bp | Selenomonas noxia                   |
| 43   | >11.29XDG137-43-M13- | 200 bp | Selenomonas noxia                   |
| 44   | >11.29XDG137-44-M13- | 200 bp | Streptococcus                       |
| 45   | >11.29XDG137-45-M13- | 199 bp | Neisseria subflava                  |
| 46   | >11.29XDG137-46-M13- | 200 bp | Veillonella genomosp                |
| 47   | >11.29XDG137-47-M13- | 194 bp | Bacteroides-like sp                 |
| 48   | >11.29XDG137-48-M13- | 191 bp | Actinomyces odontolyticus           |
| 49   | >11.29XDG137-49-M13- | 195 bp | Prevotella                          |
| 50   | >12.6XDG137-50-M13-  | 179 bp | Fusobacterium                       |

附:测序序列及在 [http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) 网站上比对结果 >1

表 4 口腔菌群特异性引物扩增片段序列分析结果

| 条带编号                      | 菌属名称                      | 序列比对符合率(%)                  |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 4, 7, 20, 23, 28, 31, 37, | Capnocytophaga            | 100, 89, 97, 98, 98, 93, 92 |
| 3                         | Gemella                   | 97                          |
| 9, 15, 33, 41, 49         | Prevotella                | 100, 78, 100, 86, 93        |
| 10                        | Campylobacter             | 100                         |
| 12, 18                    | Porphyromonas             | 98, 100                     |
| 13                        | Granulicatella            | 97                          |
| 14                        | Ruminococcaceae           | 96                          |
| 17, 44                    | Streptococcus             | 97, 97                      |
| 19, 45                    | Neisseria                 | 95, 100                     |
| 24                        | Lachnospiraceae           | 100                         |
| 30                        | Leptotrichia              | 100                         |
| 25                        | Lactococcus               | 100                         |
| 26, 29, 42, 43            | Selenomonas               | 94, 96, 98, 97              |
| 27                        | Clostridium               | 96                          |
| 34                        | Haemophilus               | 100                         |
| 35, 36, 40, 46            | Veillonella               | 91, 100, 100, 93            |
| 47                        | Bacteroides-like sp       | 100                         |
| 48                        | Actinomyces               | 100                         |
| 50                        | Fusobacterium             | 98                          |
| 1, 5, 11                  | TM7_genera_incertae_sedis | 97, 94, 96                  |

表 5 各组口腔菌群种类构成情况

| 组别     | 菌属名称                      | 条带编号             |
|--------|---------------------------|------------------|
| 正常对照组  | Gemella 双胎溶血菌属            | 3                |
|        | Prevotella 普氏菌属           | 9                |
|        | Porphyromonas 卟啉单胞菌属      | 12               |
|        | Ruminococcaceae 瘤胃球菌属     | 14               |
|        | Lachnospiraceae 毛螺菌属      | 24               |
|        | Selenomonas 月形单胞菌属        | 26               |
|        | Clostridium 梭状芽孢杆菌        | 27               |
|        | Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌  | 28, 31           |
|        | Haemophilus 嗜血杆菌          | 34               |
|        | Veillonella 韦永氏球菌属        | 35, 40, 46       |
| HFMD 组 | TM7_genera_incertae_sedis | 1, 5, 11         |
|        | Capnocytophaga 嗜二氧化碳噬细胞菌  | 4, 7, 20, 23, 37 |
|        | Prevotella 普氏菌属           | 15, 33, 41       |
|        | Campylobacter 弯曲菌属        | 10               |
|        | Granulicatella            | 13               |
|        | Porphyromonas 卟啉单胞菌属      | 18               |
|        | Streptococcus 链球菌属        | 17, 44           |
|        | Neisseria 奈瑟氏菌属           | 19, 45           |
|        | Leptotrichia 纤毛菌属         | 30               |
|        | Selenomonas 月形单胞菌属        | 29, 42, 43       |
| HGS 组  | Veillonella 韦永氏菌属         | 36               |
|        | Bacteroides-like sp       | 47               |
|        | Actinomyces 放线菌           | 48               |
|        | Fusobacterium 梭菌属         | 50               |
|        | Lactococcus 乳球菌属          | 25               |
|        | Prevotella 普氏菌属           | 49               |

### 3 讨论

**3.1** DGGE 作为一种高质量的指纹技术,可用于灵敏检测微生物群落中的优势菌,且指纹图谱的条带数量在一定程度上反映了群落中优势菌组成的多样性。通过回收图谱中具有重要意义的条带,克隆测序,可以进一步确定该菌属的种类。作为比较微生物群落多样性和监测群体动态的分子学工具,DGGE 已经被迅速应用于自然界复杂的微生物生态系统的研究中。目前国外学者已经将其作为一种新的研究方法,初步应用于口腔微生物群落组成的研究中。在口腔微生物的总体分析研究中,唾液一直是关注的重点,因其在维持口腔微生态平衡中起着重要的作用。唾液中的大量细菌来自牙齿、舌、颊黏膜等各个部位,其组成和波动直接或间接反映了口腔微生物群落的动态变化。Rasiah 等<sup>[3]</sup>应用 DGGE 方法监测同一个体唾液微生物群落 7 年间的动态变化,并比较分析了 10 份不同个体唾液和牙菌斑微生物群落在人工口腔中的组成变化。研究发现,同一个体唾液微生物群落保持着长期的相对稳定,而不同个体间牙菌斑菌群构成和优势菌各有其独特性。Li 等<sup>[4]</sup>探讨了常规口腔护理及预防性治疗后口腔微生物的变化,DGGE 分析发现空白对照组和以上两实验组口腔菌落组成均有明显差异。因此,唾液样本在 DGGE 技术检测中,能较准确有效地监测口腔微环境的动态发展变化。本研究对象为 3 岁左右儿童,配合程度较差,唾液标本易获得,检测结果可靠。

**3.2** HFMD 为儿童常见病之一,是由多种肠道病毒引起的常见传染病,各年龄组均可感染发病,但以 < 3 岁年龄组发病率最高。主要表现为口腔黏膜溃疡性疱疹及四肢末端水疱样皮疹<sup>[2]</sup>。作为我国丙类传染病,该病每年均有发病爆发期,患儿往往因口腔症状拒食、哭闹,不能安睡导致全身症状加重,该病作为长期被口腔临床忽视的疾病应重新认识。目前国内外学者研究的重点在于病因与预防,治疗手段欠缺。尽管 HFMD 为病毒感染疾病,为了避免继发细菌感染加重病情,临床治疗中应用抗生素相当普遍,但尚缺乏病原学支持。手足口病的口腔病变可能会对全身系统造成影响,因此了解手足口病口腔微生物群落结构变化,对于治疗手足口病、合理应用

抗生素有重要意义。本研究通过应用 PCR-DGGE 技术分析了 3 例 HFMD 唾液样本,与正常对照组相比菌落结构更复杂,嗜二氧化碳噬细胞菌为主要菌属,月形单胞菌属其次,提示临床治疗可应用对相关细菌抑菌杀菌有效的药物含漱或局部清洗、涂布。

**3.3** HGS 是小儿常见的以单纯疱疹病毒 I 型(HIS-I)感染为主的口腔黏膜感染性疾病,多见于 1~3 岁小儿,主要表现为疼痛、流涎、拒食,可有发热、牙龈红肿和颌下淋巴结的肿大、压痛。疱疹溃破后易合并细菌感染。该病与 HFMD 的口腔症状相似,临床上对两者的口腔治疗也基本相同,但本研究结果显示,两种疾病患者口腔内微生物结构差异明显,HFMD 者更复杂多样。提示两种疾病在临床治疗中应更有针对性。

**3.4** DGGE 技术在研究微生物群落动态变化和多样性方面存在很多优势,但是该技术难以精确分析细菌代谢活性、数量和基因表达水平方面的信息。Muyzer 等<sup>[5]</sup>指出 DGGE 法只能对微生物群落中数量上 > 1% 的优势种群进行分析。此外,不同实验条件以及在样品采集、总 DNA 提取及 PCR 扩增等每一个实验步骤中微小的误差都将影响 DGGE 的分析结果。本研究作为初步探索,样本量小,尚不能下定论,但所得结果明显是有意义的,随着研究的深入,将实验室数据与临床治疗相结合,势必会令广大患儿受益。

### 参考文献

- 1 国家卫生部.手足口病诊疗指南(2010 版)[M].北京:国家卫生部,2010.
- 2 石四箴,主编.儿童口腔医学[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2008:158-159.
- 3 Rasiah IA, Wong I, Anderson SA, et al. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(9): 779-787.
- 4 Li Y, Saxena D, Barnes VM, et al. Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(5): 333-339.
- 5 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.

[收稿日期 2014-10-13][本文编辑 黄晓红]