

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.007

高脂高果糖饮食与维生素 D 缺乏对小鼠牙龈菌群影响的实验研究*

杨 宓, 柏 雪

(四川省成都市第四人民医院口腔科 610036)

[摘要] **目的** 检测在高脂高果糖饮食和维生素 D 缺乏条件下小鼠龈下菌群变化,探讨其导致牙周病变的可能机制。**方法** 正常型和维生素 D 受体敲出的野生型 C57BL/6J 小鼠各 20 只,各自随机分成正常饮食组和高脂高果糖饮食组,每组 10 只。喂养 10 周后检测下颌第 2 磨牙牙周炎临床指标,提取龈沟液,采用 PCR-变形梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)和 DNA 测序等方法分析龈沟液的菌群差异性。**结果** 与正常型高脂高果糖组比较,维生素 D 受体敲出型高脂高果糖组在牙龈指数、牙周袋深度、牙松动度方面差异有统计学意义($P < 0.05$);正常型高脂高果糖组、维生素 D 敲出型组与正常型正常饮食组比较,小鼠龈沟液菌群分布差异有统计学意义($P < 0.05$);测序结果显示正常型高脂高果糖组和维生素 D 受体敲出型高脂高果糖组小鼠的优势菌群不完全相同。**结论** 通过成功建立所需牙周炎动物实验模型,初步证明维生素 D 缺乏对高脂高果糖所致牙周炎的发展可能存在正协同作用。

[关键词] 牙周病;维生素 D;C57BL/6J 小鼠;高脂高果糖

[中图分类号] R378

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)36-5071-03

Experimental research in the effect of high fat high fructopyranose and Vitamin D receptor-knock-out on subgingival bacterial diversity in mice*

Yang Mi, Bai Xue

(Department of Stomatology, the Fourth People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610036, China)

[Abstract] **Objective** To detect the oral bacterial diversity in mice under high fat and high fructopyranose diet or/and Vitamin D receptor-knock-out conditions, in order to study the mechanism between the two conditions and periodontitis. **Methods** C57BL/6J wild type mice including 20 normal ones and 20 Vitamin D receptor-knock-out ones, were divided into normal diet and high fat and high fructopyranose diet groups respectively, 10 cases in each group. After feeding 10 weeks, collecting gingival crevicular fluid from second mandible molar, analysing the bacterial diversity of the gingival crevicular fluid by using Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method. Collecting specific bands for DNA sequence assay. **Results** Comparing with normal mice feeding with high fat and high fructopyranose diet, the gingival index, periodontal pocket and tooth mobility of Vitamin D receptor-knock-out mice feeding with high fat and high fructopyranose diet had obvious statistical difference ($P < 0.05$); the distribution of the gingival bacterial diversity between normal mice with normal food and other 3 groups had statistical difference ($P < 0.05$). The results of sequence assay showed that the dominant bacteria between normal mice with high fat and high fructopyranose diet and Vitamin D receptor-knock-out mice with high fat and high fructopyranose diet was not the same. **Conclusion** It has successfully built a animal model for periodontitis research of high fat and high fructopyranose diet or/and Vitamin D deficient, the periodontitis will get worse under the effect of the two factor.

[Key words] periodontitis; Vitamin D; C57BL/6J mice; high fat and high fructopyranose

牙周病是一种微生物感染性疾病,致病性微生物是引发牙周病必不可少的始动因素,人群发病率高达 90% 以上^[1]。饮食偏好会导致其牙周菌群的改变,进而影响宿主的牙周健康,如大量临床调查或动物实验数据表明高脂高糖饮食导致牙周疾病的发生^[2-4]。有研究表明,维生素 D 缺乏可能是牙周疾病产生的重要促进因素^[5]。中国约 50% 的人群缺少维生素 D,对牙周健康具有较大的潜在风险。既往研究多着眼于高脂高糖饮食与维生素 D 缺乏分别独立作用下的牙周病变;而关于在二者即双因素共同作用下牙周炎罹患情况的相关研究则未见报道。本实验采用维生素 D 受体缺失的小鼠,通过建立高脂高果糖饮食动物实验模型,运用 PCR-变形梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)对龈沟液中的菌群进行多样性分析,探究两种

因素对牙周炎致病菌群的影响,并进一步探讨牙周病致病相关因素。

1 材料与方

1.1 主要材料 雄性 4 周龄 C57BL/6J 野生型小鼠 20 只,雌性 4 周龄维生素 D 受体基因敲出 C57BL/6J 野生型小鼠 20 只,由四川大学实验动物中心提供。分别将正常型和基因敲出型小鼠各自随机分为两组(每组 10 只),给予不同饮食喂养。实验分成如下 4 组:正常型正常饮食组(N 组)、正常型高脂高果糖饮食组(H 组)、维生素 D 受体缺失的正常饮食组(DN 组)、维生素 D 受体缺失的高脂高果糖饮食组(DH 组)。PCR 扩增仪、凝胶成像仪(Bio-RAD 公司,美国),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),PCR 缓冲体系(由上海生工生物工程有限

* 基金项目:成都市卫生局青年基金资助项目(2013064)。 作者简介:杨宓(1979-),副主任医师,在读博士,主要从事临床口腔正畸研究。

公司提供)。

1.2 牙龈沟液采集方法 按照分组的饮食条件喂养 10 周^[6]。采样前饥饿 12 h, 0.1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg, 国药集团化学试剂有限公司)麻醉后, 用 whatman 1 号滤纸提取小鼠下颌第 2 磨牙龈沟液。定量后用生理盐水溶解, -80 °C 保存。

1.3 DNA 提取 样本室温解冻, 加入 0.5 mL 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl 溶液, pH 8.0), 加入溶菌酶至浓度 10 mg/mL。37 °C 水浴 10 min, 然后加入十二烷基硫酸钠(SDS)至 1% (质量/体积), 加入蛋白酶 K 至 0.1 mg/mL, 37 °C 水浴 30 min。利用酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)提取, 然后用 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 最后用不含 DNase 的 RNase 去除 RNA, DNA 样品用于 PCR 扩增。

1.4 PCR 扩增 PCR 引物: 细菌微生物属种的变化使用 16 Sr RNA V3 作为扩增引物; 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'; 下游引物: 5'-GC clamp * -TAC GGG AGG CAG CAG-3'^[7](上海生工生物工程有限公司合成)。PCR 反应体系: DNA 模板 0.005 mL, 上下游引物(0.01 mmol/L)各 0.000 5 mL, 10× 缓冲液(不含 MgCl₂)0.002 5 mL, MgCl₂(2.5 mmol/L) 0.002 mL, 10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸 0.000 5 mL, 1 UL 的 TaqDNA 聚合酶(上海生工生物工程有限公司), 无菌三蒸水补足总体积至 0.025 mL。PCR 反应条件: 预变性 95 °C 5 min, 变性 94 °C 30 s, 退火 55 °C 60 s, 延伸 72 °C 90 s, 共 30 个循环, 循环结束后, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.5 DGGE 分析 采用 80 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶, 20%~70% 的变性梯度(100% 变性梯度包含体积分数 40% 的甲酰胺和 7 mol 尿素)。在 220 V 电压预电泳 10 min, 接着 85 V 电压电泳 16 h, 之后用硝酸银染色^[8]。采用 Quantity One 软件对凝胶做相似性分析, 计算条带光密度值, 然后对 H 组和 DH 组中有明显优势的条带, 回收、克隆纯化、测序, 用 GenBank 中的 Blast 分析优势菌群。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件分析采集的数据。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 牙周临床指标 N 组、DN 组小鼠牙龈偶见红肿现象。H 组小鼠大部分牙龈增厚发红。DH 组小鼠牙龈则呈现暗红色, 冠周出现组织坏死且探诊出血。H 组、DH 组小鼠牙龈指数、牙周袋深度方面与 N 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且有不同程度松动, 见表 1。

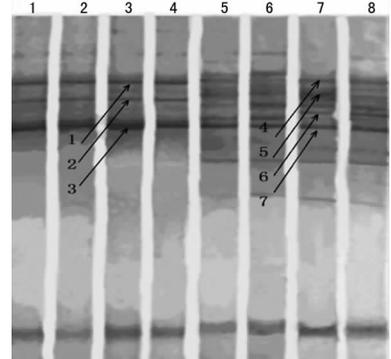
表 1 喂养 10 周后 4 组小鼠牙周临床指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	牙龈指数	牙周袋深度(mm)	牙松动
N 组	0.31 ± 0.05	0.13 ± 0.01	不明显 [#]
H 组	1.51 ± 0.09*	0.37 ± 0.02*	颊舌向 [#]
DN 组	0.39 ± 0.06	0.18 ± 0.02	不明显 [#]
DH 组	2.06 ± 0.15*	0.56 ± 0.04*	颊舌——近远中 [#]

*: $P < 0.05$, 与 N 组比较; #: 麻醉后用镊子夹住两侧的下颌第 2 磨牙, 观察松动程度(本实验中小鼠牙齿尺寸小, 对其牙松动感只进行了定性而非定量描述)。

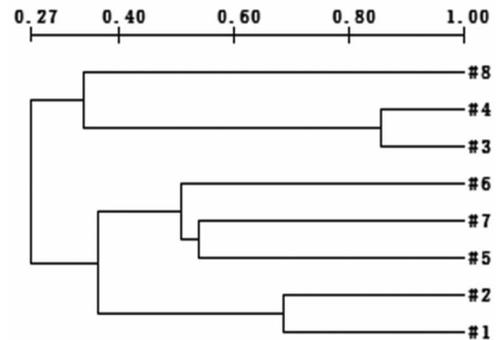
2.2 PCR-DGGE 牙周菌群多样性分析 同组中小鼠的条带数量和分布有较好的一致性, 而不同组小鼠之间的条带数量和

分布差异性明显, 尤其是维生素 D 缺乏的 2 个小组(图 1)。通过 UMPGA 相似聚类分析表明, 各组内相似性很高, 但各组之间相似性较小(图 2)。DGGE 图谱显示, 维生素 D 缺乏的 DH 组、DN 组与维生素 D 不缺乏的 N 组、H 组在丰富度和多样性指数方面比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。



1、2 为 N 组; 3、4 为 H 组; 5、6 为 DN 组; 7、8 为 DH 组; 箭头所指为切胶回收条带。

图 1 DGGE 图谱



横坐标为相似百分比, 纵坐标为条带序列号。

图 2 UMPGA 相似聚类分析

表 2 DGGE 图谱多样性分析($\bar{x} \pm s$)

组别	丰富度 R	多样性指数 H	均与度指数 E	优势度 D
N 组	7.1 ± 1.25	1.51 ± 0.05	0.94 ± 0.01	0.77 ± 0.04
H 组	9.2 ± 1.01*	1.92 ± 0.05*	0.96 ± 0.02	0.83 ± 0.03
DN 组	13.1 ± 1.62*	2.33 ± 0.02*	0.95 ± 0.02	0.86 ± 0.02
DH 组	14.7 ± 1.53*	2.41 ± 0.03*	0.97 ± 0.01	0.82 ± 0.02

*: $P < 0.05$, 与 N 组比较。

表 3 优势菌序列分析结果

组别	序列号	细菌	相似度(%)
H 组	1	DQ341410 福赛斯坦纳菌属 RMA8563	98
	2	NC002950 牙卟啉单胞菌属 W83	99
	3	AF414832 中间普雷沃菌属 24-PIN	99
DH 组	4	NC004974 放线共生放线杆菌属 pFN1	99
	5	NC002950 牙卟啉单胞菌属 W83	99
	6	CR626927 脆弱拟杆菌属 NCTC9343	99
	7	AF414832 中间普雷沃菌属 24-PIN	99

2.3 测序结果 选择有肉眼可见病变的 H 组和 DH 组开展优势菌分析。条带如图 1 中的箭头标示。经过 BLAST 测序分析,结果见表 3,H 组中条带 1 与福赛斯坦纳菌属有 99% 的同源性;条带 2 与牙卟啉单胞菌属有 99% 的同源性;条带 3 与中间普雷沃菌属有 99% 的同源性。DH 组中条带 4 与放线共生放线杆菌属具有 99% 的同源性;条带 5 与牙卟啉单胞菌属有 99% 的同源性;条带 6 与脆弱拟杆菌属有 99% 的同源性;条带 7 中间普雷沃菌属具有 99% 的同源性。

3 讨论

研究表明高脂高糖饮食诱导的代谢紊乱可导致个体牙周疾病发生^[2,9],而维生素 D 的缺乏是否也是牙周炎发生的促进因素尚存争议^[5]。现有文献均着重于二者作为独立因素作用的结果,为进一步研究维生素 D 缺乏及二者共力与牙周疾病的关系^[2],本实验建立了高脂高果糖饮食以及缺乏维生素 D 受体的动物实验模型,检测了小鼠的牙周组织临床指标、龈沟液菌群的差异性等。实验结果表明,牙周临床指标的数据显示正常饮食的 N 组和 DN 组小鼠偶见牙龈红肿的现象,高脂高果糖饮食的 H 组与 DH 组小鼠牙龈有明显炎症,且牙龈指数、牙周袋深度均显著高于正常饮食组。表明高脂高糖饮食可以促进牙周病的发生,与 Blasco-Baque 等^[2]和 Amano 等^[5]研究结果一致;DH 组小鼠牙龈指数、牙周袋深度及活动度均显著高于其他组,提示在高脂高果糖饮食和缺少维生素 D 的双重作用下,可能更易罹患牙周病。本实验结果显示 DN 组小鼠无明显炎症反应,提示在维生素 D 缺乏的单一条件下,正常饮食喂养不一定会引起牙周病。

DGGE 多样性分析显示,H 组、DN 组、DH 组小鼠的丰富度和多样性指数显著高于 N 组小鼠,说明其他 3 组小鼠龈下菌群有明显增加。与之相一致的是,H 组和 DH 组小鼠有肉眼可见的明显炎症,提示高脂高糖的饮食无论作为独立因素还是合并维生素 D 缺乏因素,都可能致使口腔菌群变化,并促进了炎症形成^[10-11]。在 DN 组,虽测及龈下菌群的增加,却没有发生相应的临床炎症表现。而以往有文献称长时间持续维生素 D 缺乏可促使牙周病产生^[5],但本研究仅进行 10 周,有可能致病菌致病力不够或刺激时间尚短,因此未能在菌群增加的情况下致炎。

UMPGA 聚类分析显示各组间有显著差异,这说明在高脂高糖饮食和维生素 D 缺乏无论作为独立还是合并刺激因素,都可导致龈下菌群种类和数量的变化^[10];但组内相似性较高,说明外环境因素(如温度、湿度等饲养条件)对实验结果基本无影响。测序结果显示 H 组和 DH 组均检测出优势中间普雷沃菌和牙卟啉单胞菌,提示高脂高糖饮食可能为这两种菌生长提供有利内环境,从而促进了牙周炎的形成;但二者是共同还是独立致病需进一步验证。此外,在 DH 组查及放线共生放线杆菌、脆弱拟杆菌等牙周可疑致病菌^[12-14],其中放线共生放线杆菌致病能力较强,协调前两种菌的共同作用也可部分解释 DH 组临床症状更为严重的原因。因此,本实验通过研究龈沟液中细菌种群和数量的变化,认为维生素 D 缺乏对高脂高糖所致牙周炎的发展有正协同作用,进而提示在牙周病的临床防治过程中,除要求患者少食高脂高糖食物外,还可适量补充维生素 D^[15]。

参考文献

[1] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune

subversion to systemic inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*,2015,15(1):30-44.

- [2] Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes JN, et al. High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens[J]. *PLoS One*,2012,7(11):e48220.
- [3] Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, et al. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2007,104(51):20466-20471.
- [4] Fentoglu O, Bozkurt FY. The Bi-birectional relationship between periodontal disease and hyperlipidemia[J]. *Eur J Dent*,2008,2(2):142-146.
- [5] Amano Y, Komiyama K, Makishima M. Vitamin D and periodontal disease[J]. *J Oral Sci*,2009,51(1):11-20.
- [6] Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease[J]. *J Biomed Biotechnol*,2011:754857.
- [7] 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.
- [8] Xiao X, Li Y, Zhang G, et al. Detection of bacterial diversity in rat's periodontitis model under imitational altitude hypoxia environment[J]. *Arch Oral Biol*,2012,57(1):23-29.
- [9] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases[J]. *Lancet*,2005,366(9499):1809-1820.
- [10] Walker AW, Ince J, Duncan SH, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota[J]. *ISME J*,2011,5(2):220-230.
- [11] Wang Q, Li H, Xie H, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 attenuates experimental periodontitis through down regulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2013,135:43-50.
- [12] Goodson JM, Groppo D, Halem S, et al. Is obesity an oral bacterial disease? [J]. *J Dent Res*,2009,88(6):519-523.
- [13] Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, et al. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis[J]. *J Clin Microbiol*,2005,43(8):3944-3955.
- [14] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. *J Clin Periodontol*,1998,25(2):134-144.
- [15] Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation[J]. *Ann Periodontol*,2001,6(1):125-137.

(收稿日期:2015-06-15 修回日期:2015-08-01)