

光动力联合龈下喷砂疗法对种植体周围炎龈沟液菌群分布改变的疗效

王海燕¹ 张冬雪¹ 粟申平¹ 姜彤²

【摘要】目的 初步探讨光动力联合龈下喷砂疗法治疗后种植体周围环境炎性因子以及微生物菌群分布的变化,为光动力疗法在种植体周围炎治疗中的应用提供理论依据。**方法** 本研究采取单中心、前瞻性、开放标签以及随机对照等研究方法,募集自2018年2月1日至2019年2月1日于首都医科大学附属北京朝阳医院口腔科就诊的伴种植体周围炎修复体共9例患者,16颗种植体,对种植体周围炎患者在接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后1周、2周、4周、12周和24周提取龈沟液,并通过龈沟液菌群分布的改变进行扩增子检测,通过生物信息学分析方法分析龈沟液菌群分布的改变,从致病菌群角度分析光动力疗法治疗种植体周围炎的可能机制(本试验分别在门、纲、目、科、属、种分类等级进行组间显著性差异分析。在Alpha多样性分析中差异分析使用R软件完成,检验方法使用秩和检验。**结果** 所有受试者均完成计划随访。接受光动力联合龈下喷砂治疗后的种植体周围炎患者治疗前后龈沟液样本的 α 多样性分析结果显示,种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗后5组Observed species、Chao及Ace指数均高于治疗前,其中Chao指数各组间差异有统计学意义($\chi^2 = 5.688$ 、 $P = 0.033$),表明各组间OTU低丰度物种的改变有差异,操作分类单元分布呈现显著变化,多为低丰度菌群改变。 β 多样性分析结果显示,基于weighted_unifrac、unweighted_unifrac和bray_curtis距离的主坐标分析均显示各组间群落多样性差异无统计学意义,多元方差分析 P 均 > 0.05 。其中基于非加权Unifrac距离的主坐标分析提示治疗后24周与其他组区分更为明显,组间两两比较显示治疗后24周与其他5组 β 多样性差异均有统计学意义(P : $\chi^2 = 7.751$ 、 $P = 0.005$; W1: $\chi^2 = 6.471$ 、 $P = 0.011$; W2: $\chi^2 = 4.997$ 、 $P = 0.025$; W4: $\chi^2 = 3.612$ 、 $P = 0.0415$; W12: $\chi^2 = 3.125$ 、 $P = 0.0486$),提示在不考虑丰度信息下,治疗后24周群落的多样性与前组显著不同。**结论** 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前后多组间的龈沟液菌群组成未发生显著变化,治疗后24周的物种多样性显著高于治疗前,主要体现在非优势菌的增加。为进一步研究该疗法对种植体周围炎在调节局部微生态环境、长期维护过程中发挥的作用提供了理论基础。

【关键词】 种植体周围炎; 龈下喷砂疗法; 光动力疗法; 菌群分布; 随机对照试验

Curative effect of photodynamic therapy combined with subgingival sandblasting on the change of microflora distribution of gingival crevicular fluid of patients with peri-implantitis Wang Haiyan¹, Zhang Dongxue¹, Su Shengping¹, Jiang Tong². ¹Department of Stomatology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China; ²Department of Stomatology, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100020, China

Corresponding author: Jiang Tong, Email: jiangtong77@126.com

【Abstract】Objective To preliminatively investigate the changes of inflammatory factors and microbial flora distribution in the environment around implants following photodynamic therapy (PDT) combined with subgingival sandblasting therapy, and to provide theoretical basis for the application of PDT in the treatment of peri-implant inflammation. **Methods** A single-center prospective, open-label, randomized controlled study were adopted. Total of 9 patients and 16 implants were recruited from February 1st, 2018 to February 1st, 2019 in the Department of Stomatology of Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University. Gingival crevicular fluid (GCF) was extracted from patients with peri-implantitis before combined therapy and after different treatment times, the changes of microflora in GCF were detected by amplifiers.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.06.006

基金项目: 首都医科大学科研创新项目 (No. XSKY2022263)

作者单位: 100020 北京, 首都医科大学附属北京朝阳医院口腔科¹; 100102 北京, 中国中医科学院望京医院口腔科²

通信作者: 姜彤, Email: jiangtong77@126.com

Furthermore, changes of microflora distribution in GCF were revealed by bioinformatics analysis, in order to analyze the possible mechanism of PDT in the treatment of peri-implantitis from the point of view of pathogenic bacteria. In Alpha diversity analysis, R software was used for difference analysis, and rank-sum test was used for test. **Results** All patients completed the planned follow-up. The α diversity analysis of GCF samples of patients before and after combined treatment showed that Observed species, Chao and Ace index of 5 groups of patients were all higher than before treatment, and Chao index showed significant difference among groups ($\chi^2 = 5.688, P = 0.033$). β diversity analysis showed no significant difference in community diversity among groups (all $P > 0.05$). The principal coordinate analysis based on the unweighted Unifrac distance showed that the difference between the two groups was significant at 24 weeks after treatment. The pairwise comparison between the two groups confirmed that the β diversity was significantly different from that of the other five groups ($P: \chi^2 = 7.751, P = 0.005$; W1: $\chi^2 = 6.471, P = 0.011$; W2: $\chi^2 = 4.997, P = 0.025$; W4: $\chi^2 = 3.612, P = 0.0415$; W12: $\chi^2 = 3.125, P = 0.0486$), indicating that colony diversity was significantly different from that of the former group at 24 weeks after treatment without considering abundance information. **Conclusions** There was no significant change in the composition of GCF in patients before and after combined therapy. The species diversity at 24 weeks after treatment was significantly higher than before, mainly reflected in the increase of non-dominant bacteria, which provides a theoretical basis for further study of the role of this therapy in the regulation of local microecological environment and long-term maintenance of peri-implantitis.

【Key words】 Peri-implantitis; Subgingival sandblasting therapy; Photodynamic therapy; Microflora distribution; Randomized controlled trial

牙列缺损是口腔医学领域最为常见的疾病之一^[1], 目前, 针对牙列缺损的治疗方式繁多, 其中种植义齿修复以其不损伤健康牙体组织、稳固、舒适和咀嚼功能强等独特优势已广泛应用于局部或全口牙缺失的患者, 逐渐成为口腔医学领域最为重要的修复手段之一^[2]。然而, 种植体相关并发症的存在很大程度上降低了种植修复的成功率, 而且难以获得理想的修复效果^[3], 如种植体周围炎, 作为种植术后最为常见也最为棘手的并发症之一, 在种植病例中发生率为28%~56%^[4]。种植体周围炎是一类由于局部微生物与宿主发生复杂的相互间作用引发的疾病^[5-9], 由于种植体表面存在细菌, 从而导致种植体周围软组织的炎症, 常见表现为种植体周围软组织感染、支持骨组织吸收、种植体周围袋形成以及探诊出血等^[10-12], 严重时还可以导致种植体周围骨结合遭到破坏进而产生种植体松动乃至脱落^[13-14]。目前针对种植体周围炎的治疗方式多样, 但均未能获得完全满意的临床疗效。近年来, 随着相关技术的进步, 光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 逐步进入人们的视野。PDT是一种冷光化学反应, 通过借助光敏剂在特定波长的光源照射下产生单线态氧和自由基, 破坏细菌的细胞壁和膜系统, 从而导致包括细菌、真菌以及病毒在内的多种微生物死亡^[15-16]。然而, PDT对人体内真实种植体周围炎的局部环境是否具有可靠的杀菌性能鲜少报道, 目前多为体外模拟生物膜进行PDT后观察细菌数量的减少^[17-18]。但对菌群的变化情况仍存

在争议。

本研究通过临床试验评估PDT应用于种植体周围炎后较长时间的临床效果, 观察PDT治疗后种植体周围环境的菌群动态变化及其是否能够维持种植体周围长期的健康状态, 旨在为PDT疗法在种植体周围炎中的推广提供理论依据, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

本研究募集自2018年2月1日至2019年2月1日于首都医科大学附属北京朝阳医院口腔科就诊的伴种植体周围炎修复体共9例患者、16颗种植体。所有参与本研究的患者均为无系统性疾病的健康成年人, 近3个月无服用抗炎药物、口服抗菌药物或系统性抗菌药物史。

针对怀疑伴有种植体周围炎的种植体, 进行近中颊侧、颊侧、远中颊侧、近中舌侧、舌侧和远中舌侧6个位点的探查, 检测指标包括牙周袋深度 (pocket depth, PD)、探诊出血 (bleeding on probe, BOP) 以及流脓情况。每位患者均拍摄锥形束计算机X线断层扫描 (cone-beam computed tomography, CBCT) 以检测骨质附着情况。根据临床及影像学数据, 种植体周围炎诊断指标为: $PD \geq 4 \text{ mm}$, 出现BOP或流脓, 伴有影像学骨丧失改变。

针对符合种植体周围炎诊断的患者, 采用光动力联合龈下喷砂疗法进行临床治疗: 龈下喷砂方式

机械清创后进行PDT治疗,其中PDT采用Helbo光动力治疗仪(Helbo Photodynamic Systems, Wels, 德国),光敏剂为亚甲基蓝。于治疗前、治疗后1周、2周、4周、12周及24周提取龈沟液样本并进行扩增子检测和分析。

本研究获得首都医科大学附属北京朝阳医院伦理委员会批准(批号:2018-科-9);参与试验的患者均签署知情同意书。

二、研究方法

1. 样本收集及DNA提取:本实验采用滤纸条法对龈沟液(gingival crevicular fluid, GCF)样本进行收集,收集方法如下:首先嘱患者以清水漱口,将待取样本区域以棉卷隔湿,吹干取样牙颊面及邻近牙龈组织,用洁治器小心去除待测种植体表面菌斑,而后将Whatman I号牙周试纸条(2 mm × 10 mm)插入测试种植体的近颊位点、远颊位点、近舌位点及远舌位点的裂隙,感到有轻微阻力时停止插入,放置30 s后取出(若滤纸条上被血迹污染则弃用,待止血后重新检测),每颗测试种植体的GCF量为上述4个位点相加总量。将每颗测试种植体的4条滤纸的湿润部分剪入一个2 ml Eppendorf管中,用锡纸密封后,迅速放入-80 °C冰箱冻存、待检。测量剩余部分的长度,换算成浸润部分的长度并记录。收集完GCF后,再检查和记录所选牙的各项临床指标。所有患者均由同一位研究者完成测量和记录工作。

将龈沟液与滤纸条分离时,向Eppendorf管中加入1 ml无菌蒸馏水,震荡1 min混匀后去除滤纸条。将待测样本离心,12 000 r/min(离心半径 $r = 13.5$ cm)离心5 min使细菌颗粒化。根据制造商说明书使用Mora-Extract DNA提取试剂盒(京都制药,日本)提取样本中脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),使用200 ml Tris-乙二酸四乙胺(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)缓冲液洗脱,并保存在-20 °C备用。

2. 细菌16S rRNA基因扩增子样本制备:使用下述聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物系统完成16S核糖体核糖核酸(ribosomal ribonucleic acid, rRNA)基因的扩增:购买自454 Life Sciences(Roche, 巴塞尔,瑞士)的带有B序列接合器的806R 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'),带有A接合器以及物种特异的十个基本条码序列的515F 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-

10-bp-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGGT-3')以及小亚单位rRNA序列。

16S rRNA基因通过如下50 μ l反应体系完成V3-4区域的扩增:10×聚合酶缓冲液、2.5 mmol/L dNTPs、每种引物0.2 μ mol/L、1.25 U TaKaRa Ex TaqHot Start试剂(TaKaRa Biomedicals, 东京,日本)以及1~2 μ l模板DNA。94 °C孵育1min变性后,PCR循环参数为98 °C(10 s)、-55 °C(30 s)、-72 °C(2 min),共35个循环,随后72 °C孵育1 min完成最后延伸。经琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,产物浓度为2%,经过充分混匀后使用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并依照制造商的使用说明书使用NucleoSpin Extract II kit试剂盒(Macherey-Nagel, 杜伦,德国)以及AMPure paramagnetic beads试剂盒(Agencourt Bioscience Corporation, 马萨诸塞州,美国)进行纯化。

3. 扩增子定量、汇集和热解测序:针对磁珠筛选合格的目的Amplicon片段,使用合格的文库进行富集制备和测序。使用KAPA Library Quantification Kit试剂盒以及Roche 454 GS 钛系统(KAPA Biosystems, 马萨诸塞州,美国)对扩增子进行定量,具体使用方法依照制造厂商说明书。并将检测样本等量汇集入单独的离心管。使用454 Life Sciences Genome Sequencer Junior 试剂盒(GS-Junior, Roche Diagnostics, 巴塞尔,瑞士)对最终所获得的 1×10^7 个分子进行454 GS焦磷酸测序,用所得数据进行后续的生物信息分析。

4. 测序分析:测序数据应用Quantitative Insights into Microbial Ecology(QIIME)软件包1.6.037完成。对所测得的序列按照如下排除标准进行筛选:序列长度< 200 bp或> 800 bp、平均质量分数低于25、出现不确切碱基、引物不匹配高于1.5、某个碱基连续出现的长度超过10、无法纠正的错误编码、或缺乏引物。符合上述任一排除标准的序列均予以排除。样品通过Barcode合并建库后对样品进行拆分,随后,按照制造商指导,应用FLASH软件(Flash Length Adjustment of Short reads, v1.2.11),利用重叠关系将双末端测序得到的成对读数组装成1条序列,得到高变区。其拼接条件为:最小匹配长度15 bp,重叠区域允许错配率为0.1。针对没有重叠关系的产物予以排除。

5. OTU聚类和物种注释:通过上述方式将原始数据进行拼接和过滤后,基于操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)进行聚类和物种分类分析。使用软件USEARCH(v7.0.1090)

按照最小匹配度97%将近似的序列结合到OTU中，并挑选每一OTU中富集度最高的序列作为该OTU的代表序列。利用UCHIME (v4.2.40) 将PCR产生的嵌合体从OTU的代表序列中去除，并使用usearch_global方法将所有样本比对回OTU代表序列即得到每个样本在OTU的丰度表。

得到OTU代表序列后，通过软件RDP classifier (v2.2) 将代表序列与数据库RDP_11_5比对，进行物种注释，置信度阈值为0.6。比对数据库为16S细菌数据库 (Greengene, V201305)。完成注释后，对没有注释结果或注释结果不属于分析项目物种的OTU予以过滤，余下OTU进行进一步分析。

6. 生物信息分析方案：将原始数据进行拼接和过滤后，进行物种分类和丰度分析，并通过单个样品多样性分析、样品间多样性分析以及样品间物种组成聚类分析进行不同侧面的样品多样性分析，为探讨治疗前后不同时间点龈沟液的菌群差异。单个样品多样性分析采用Alpha多样性分析方法，并通过Mothur (v1.31.2) 软件计算样品的Alpha多样性值并用R (v3.1.1) 做稀释曲线图。样品间多样性分析常采用Beta多样性分析方法，通过QIIME (v1.80) 软件完成。LEfSe分析通过在线网站 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 完成。

三、统计学处理

应用Metastats软件、R软件及SPSS 16.0进行统计分析。Benjamini-Hochberg方法进行矫正，使用校正后的伪发现率 (false discovery rate, FDR) 评估差异的显著性。本试验分别在门、纲、目、科、属、

种分类等级进行组间显著性差异分析。在Alpha多样性分析中差异分析使用R软件完成，检验方法使用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、一般资料

共募集9例患者、16颗种植体进行分析 (表1)。9例患者中男性3例，女性6例，男女比例为1:2。患者年龄为21~54岁，平均年龄为(41.1 ± 9.99) 岁。16颗种植体中，磨牙种植体12颗 (75.0%)，前磨牙种植体2颗 (12.5%)，前牙种植体2颗 (12.5%)。

基于OTU数量绘制的稀释性曲线，每个样本的曲线末端趋向平坦，表明每个样本的测序数据量已足够，可覆盖大多数细菌，继续测序不会产生较多新的OTU，可用于后续分析 (图1)。

二、操作分类单元种类及丰度分析

针对所获取的龈沟液样本进行操作分类单元OTU分析结果见图2，在所获取的种植体周围炎患者治疗前、治疗后1周、治疗后2周及治疗后4周的龈沟液样本中，共检测出385种共有OTU。治疗前，治疗后4周、12周及24周的龈沟液样本中，共检测出380种共有OTU由图示韦恩图可见，在97%相似度区间下，治疗前OTU数量为636，治疗后1周OTU数量为760，治疗后2周及治疗后4周分别为527和795，治疗后12周和24周分别为599和610。治疗后1周、2周、4周、12周和24周样本与治疗前相比分别有270、89、

表1 入组9例患者一般信息及样本编号

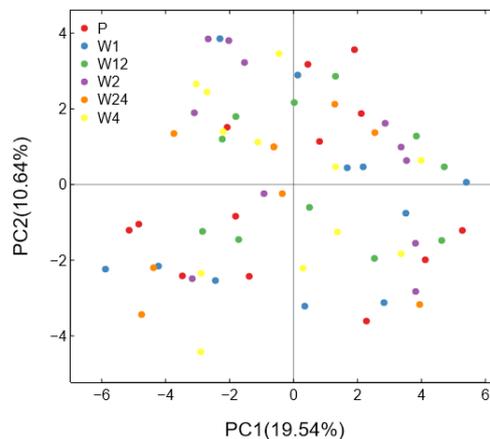
患者序号	性别	年龄	牙位*	样本编号					
				治疗前	治疗后1周	治疗后2周	治疗后4周	治疗后12周	治疗后24周
1	女	39	35	S46	S47	S49	S55	S89	S114
2	男	37	36	S40	S48	S52	S58	S84	S103
3	男	30	12	S51	S53	S41	S63	S95	S109
4	女	52	36	S10	S20	S31	S44	S75	S107
			26	S11	S19	S32	S42	S74	S106
			14	S12	S22	S33	S45	S73	S105
			37	S13	S21	S30	S43	S76	S108
5	女	21	11	S17	S27	S34	S54	S83	S115
6	女	45	37	S4	S6	S14	S39	S80	S104
			26	S5	S7	S15	S38	S79	S113
7	男	47	46	S23	S25	S36	S57	S82	S112
			26	S24	S26	S35	S56	S81	S111
8	女	45	46	S86	S90	S92	S97	S126	S116
			36	S87	S91	S93	S98	S127	S117
9	女	54	47	S61	S66	S71	S77	S101	S118
			37	S62	S67	S72	S78	S102	S119

注：* 牙位记录采用国际牙科联合会记录法记录

311、136和171种OTU不同。其中治疗后2周较1周和治疗前多20种特有OTU，治疗后4周较之前多209种特有OTU，治疗后12周较治疗后4周和治疗前多73种特有OTU，治疗后24周较治疗后4周和治疗前多73种OTU，治疗后24周较治疗前、治疗后4周和12周多80种特有OTU。

基于OTU的主成分分析（principal component analysis, PCA）结果见图3。结果显示上述5个治疗组间未呈现出显著差异，提示治疗前和治疗后龈沟液样本在PC1和PC2层面均呈现较为均匀的分布，微生物群组成差异不显著。

种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法不同时间点获取的龈沟液样本OTU物种多样性如图4所示。OTU等级曲线显示了所获得的不同样本的物种丰富度和均匀度，曲线在横轴上跨越的范围越大，物种丰富度越高，曲线越平缓，物种分布越均匀。图示结果提示本试验中检测的多数样本



注：P：治疗前龈沟液样本；W1：治疗后1周龈沟液样本；W2：治疗后2周龈沟液样本；W4：治疗后4周龈沟液样本；W12：治疗后12周龈沟液样本；W24：治疗后24周龈沟液样本

图3 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后不同时间点龈沟液样本检测操作分类单元主成分分析

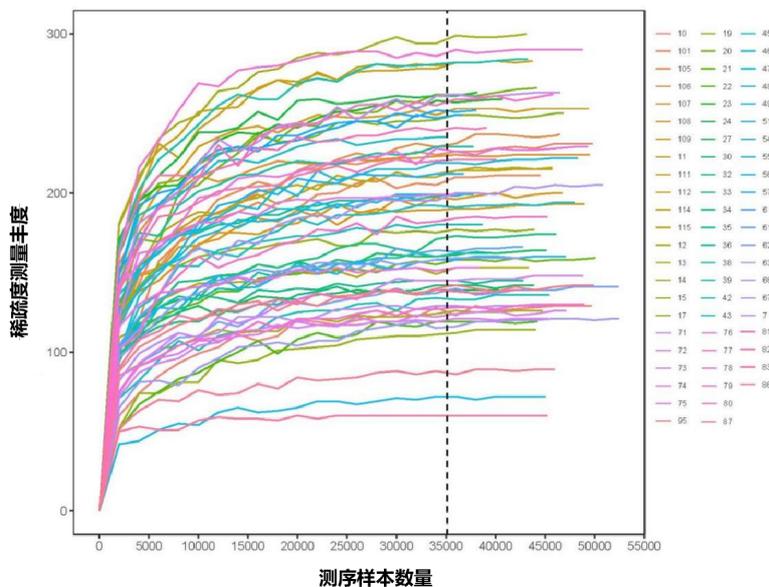


图1 种植体周围炎患者GCF样本测序数据的稀稀性曲线



注：P：治疗前龈沟液样本；W1：治疗后1周龈沟液样本；W2：治疗后2周龈沟液样本；W4：治疗后4周龈沟液样本。W12：治疗后12周龈沟液样本。W24：治疗后24周龈沟液样本

图2 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后不同时间点龈沟液样本检测操作分类单元韦恩图

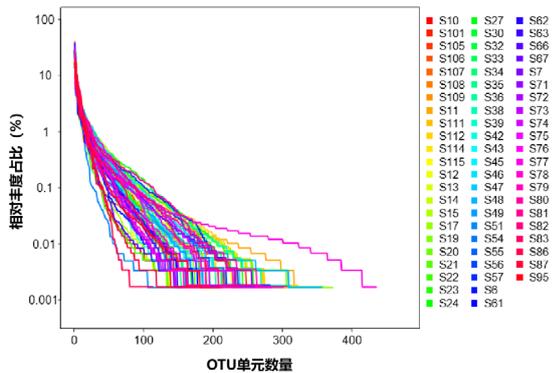
的丰富度及均匀度较为类似, 仅个别样本丰富度及均匀度高于其他样本。

三、物种及其丰度分析

对所获取的OTU样本, 在纲、科、属等不同层面对物种进行分析, 结果见图5。在纲水平, 治疗前OTU样本主要分布为杆菌纲、类菌纲、β-变形杆菌纲、梭杆菌纲和梭状芽胞杆菌纲, 也有部分样本未显示出杆菌纲占优势; 在科分类水平, 样本主

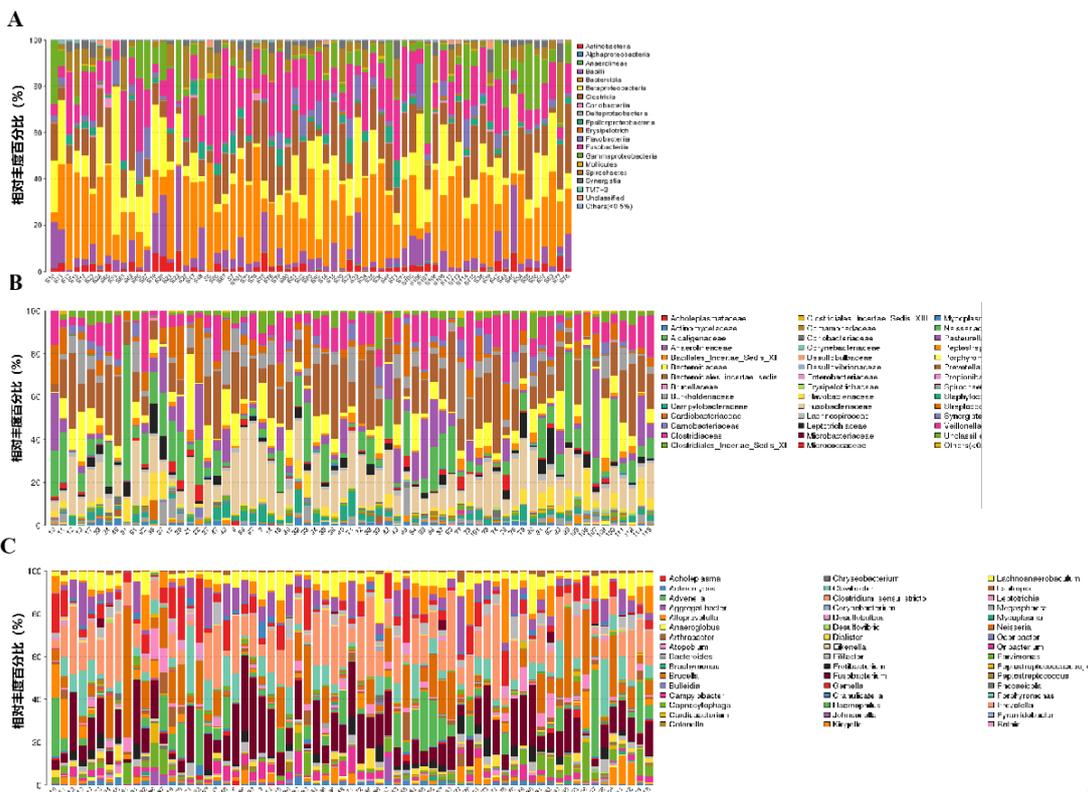
要分布为梭杆菌科、奈瑟菌科以及普氏菌科, 而在部分样本中也显示出韦荣球菌科优势分布; 在属分类水平, 优势属为韦荣球菌属、普氏菌属、嗜血杆菌属和梭杆菌属, 部分样本也富含链球菌属、放线菌属、杆菌属、β-变形菌属、γ-变形菌属等。而无论在哪一水平, 研究结果均显示大部分接受光动力联合龈下喷砂疗法的种植体周围炎患者治疗后1周、2周、4周、12周及24周均显示出类似的细菌种类, 仅有个别患者治疗前及治疗后出现显著不同的细菌种类。

为比较不同样本在纲、科、属水平的分布, 利用R-gplots插件绘制热图如图6所示: 在纲分类水平, 所有样本整体优势菌群为梭杆菌纲、拟杆菌纲以及梭状芽胞杆菌纲, 次优势菌群为β-变形杆菌纲、杆菌纲、γ-变形杆菌纲和黄杆菌纲, 而厌氧菌纲、δ-变形菌纲、α-变形菌纲、红蝱菌纲则分布较少, 但在某些样本中富含互氧菌纲。此外, 在部分种植体周围炎患者不同时期或不同牙位的龈沟液样本中显示出类似的菌群分布, 诸如取自于同一例患者的治疗后第12周及第4周龈沟液样本S101和S77菌群分布类似、取自于同一例患者不同牙位的龈沟液样本S86和S87菌群分布类似、取自于同一例患者



注: S10-S101为收集样本中随机选取的部分样本

图4 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后所有龈沟液样本检测操作分类单元等级曲线分析



注: A: 物种纲水平; B: 物种科水平; C: 物种属水平

图5 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后所有龈沟液样本物种分析柱状图

治疗后第2周和治疗后第12周龈沟液样本S79和S15菌群分布类似等。

热图结果显示，以科的分类水平而言，优势菌群为普氏菌科、梭杆菌科和韦荣菌科。此外，S77、S80、S7、S107、S95等部分样本显示出富含螺旋体科、卟啉单胞菌科、链球菌科、奈瑟菌科及巴斯德雷菌科。近乎所有样本中，下述菌群均显示较低丰度，包括：无胆菌科、BS11科、臭杆菌科、茴香菊科、脱硫球杆菌科、肠杆菌科、S24-7科、微杆菌科、产碱杆菌科、布鲁菌科、脱硫弧菌科、梭状芽孢杆菌科、葡萄球菌科和拟杆菌科。在科的分类层面，也有部分样本表现出类似的群落组成，包括取自于治疗后第24周的龈沟液样本S111和S112、取自于治疗前的龈沟液样本S86和S87、分别取自于治疗后第2周和治疗后第4周的龈沟液样本S30和S43、分别取自于治疗后第2周和治疗后第12周的龈沟液样本S35和S81、取自于治疗后第4周的龈沟液样本S56和S57。

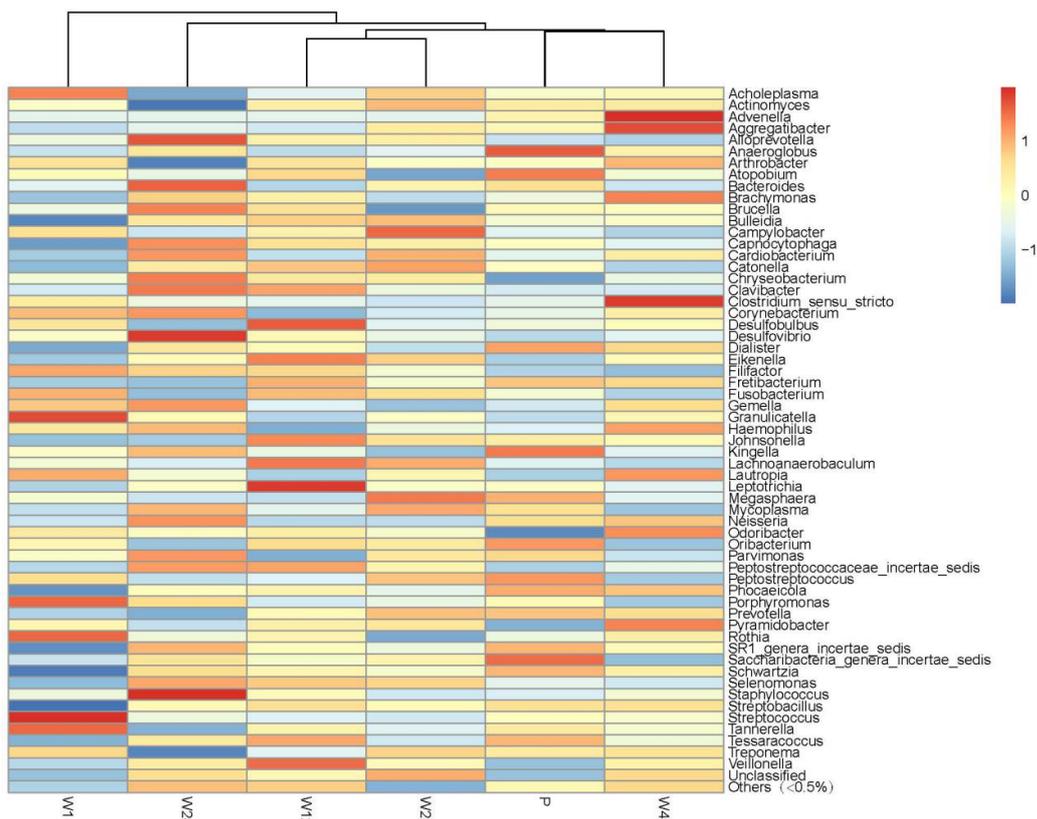
基于类似的分析方法，在属分类层面，主要细菌群体为梭杆菌属、普氏菌属以及未分类菌属，部分样本还显示出富集链球菌属、奈瑟菌属和卟啉单

胞菌属。除此以外，在所有样本中下述菌群均显示较低丰度，包括丁酸弧菌属、脱硫叶菌属、SHD-231属、臭味杆菌属、锥体杆菌属、厌氧菌属和异杆菌属。分组聚类热图如图7所示，在属水平上，治疗后1周与24周菌群结构较为相似，治疗后2周与12周较为相似，治疗前与治疗后4周较为相似，提示治疗后菌群结构动态改变，短期（1周内）变化明显，随后长期变化（12~24周）与治疗前更为不同。

为探讨各菌群物种间发育关系及进化关系，构建属水平系统进化树（图8），结果显示放线菌属、拟杆菌属、厚壁菌属和变形杆菌属具有较高丰度，进化关系较近，而变形杆菌属与其他属距离较远。

四、样品多样性分析

龈沟液样本的 α 多样性分析结果见图9：种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗后5组Observed species、Chao及Ace指数均高于治疗前，说明治疗后群落含有的OTU数目更多，其丰富度更高，可以发现治疗后24周即半年时物种丰富度最高。从香农指数可以看出，随着治疗后时间的增加，群落多样性在治疗后4周略有下降，但在12



注：P：治疗前龈沟液样本；W1：治疗后1周龈沟液样本；W2：治疗后2周龈沟液样本；W4：治疗后4周龈沟液样本；W12：治疗后12周龈沟液样本；W24：治疗后24周龈沟液样本

图7 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后所有龈沟液样本物种属水平组间热图

周, 尤其24周时又增加。治疗前后各组间辛普森指数表明治疗后1周群落的优势菌增多, 群落多样性较低, 随后数值下降, 群落多样性较治疗后1周增高, 略高于治疗前。上述指数中仅Chao指数各组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.688$, $P = 0.033$), 其余指数 P 值均 > 0.05 , 由于Chao指数通过计算群落中只检测到1次和2次的OTU数目来估计群落中实

际存在的物种数, 对低丰度物种相对敏感, 因此或可表明各组间OTU低丰度物种的改变有差异。

各组间 β 多样性分析结果表明基于weighted_unifrac、unweighted_unifrac和bray_curtis距离的主坐标多元方差分析显示各组间群落多样性差异均无统计学意义 ($P = 0.822$, 0.336 , 0.972) (图10)。其中基于非加权Unifrac距离的主坐标分析

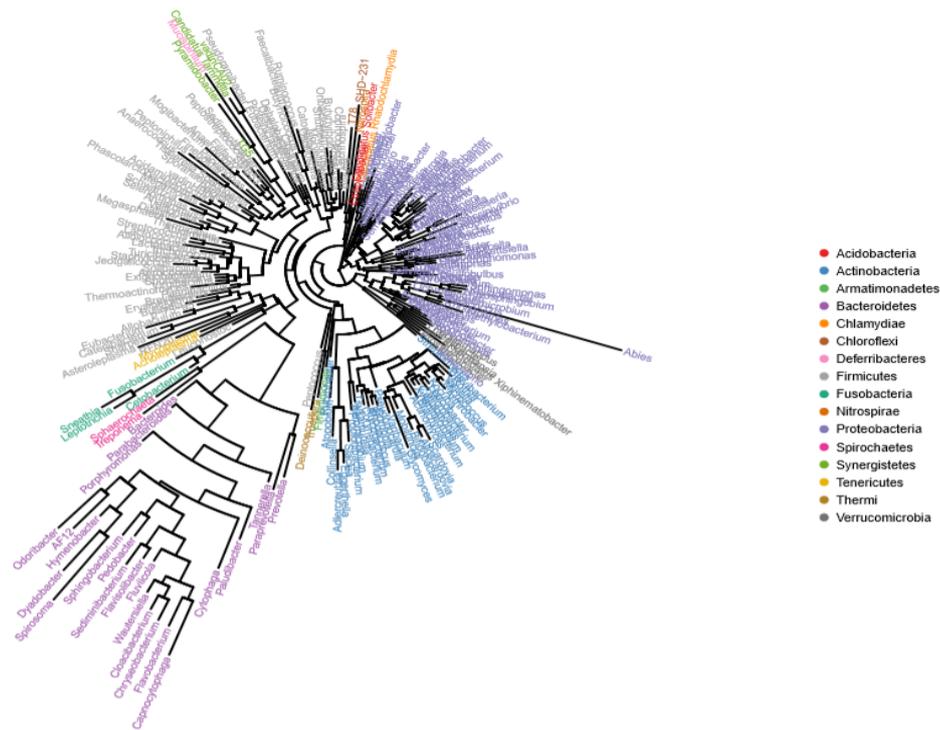
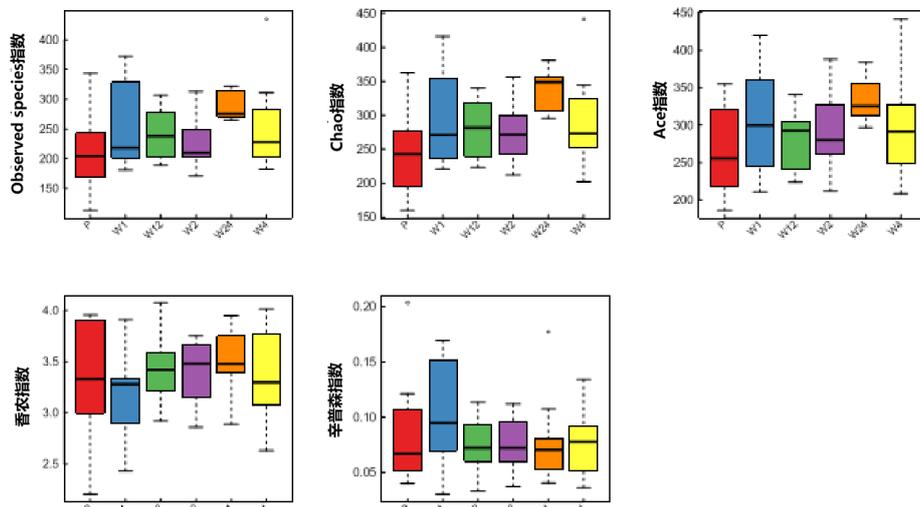
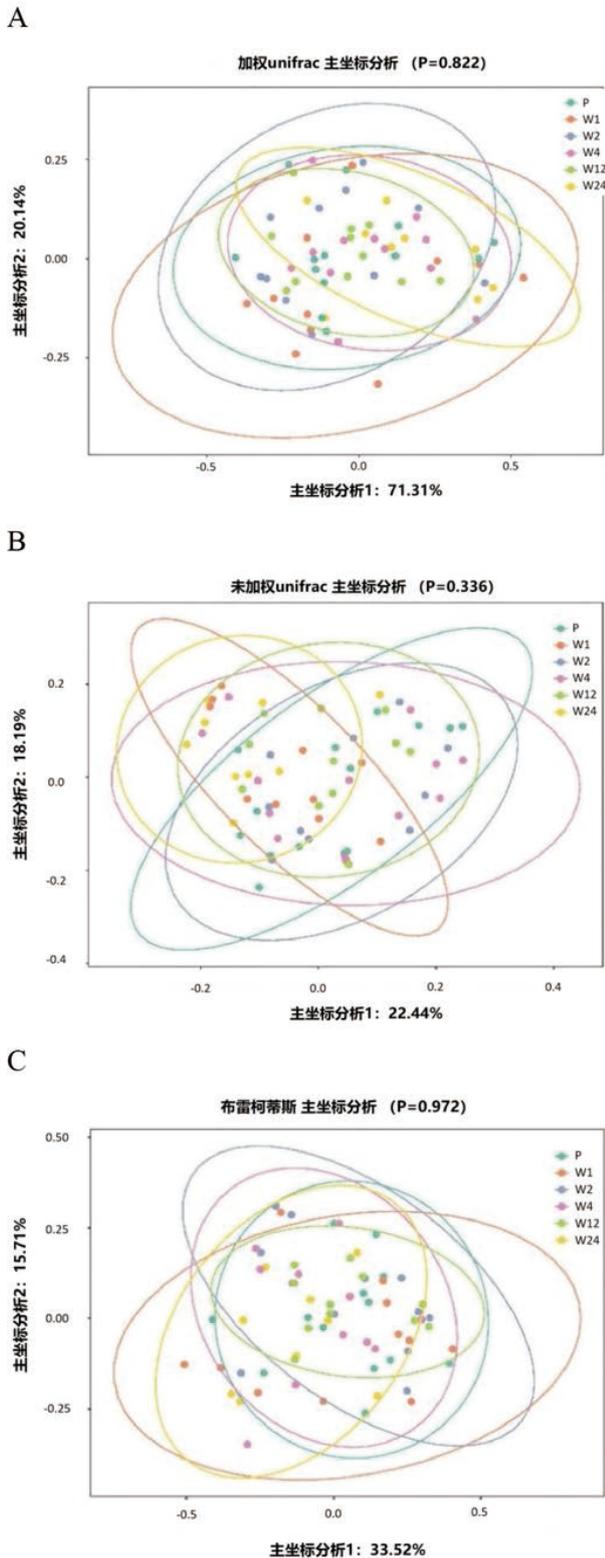


图8 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后所有龈沟液样本物种分析系统进化树



注: P: 治疗前龈沟液样本; W1: 治疗后1周龈沟液样本; W2: 治疗后2周龈沟液样本; W4: 治疗后4周龈沟液样本; W12: 治疗后12周龈沟液样本; W24: 治疗后24周龈沟液样本

图9 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后不同时间点龈沟液样本单样本多样性分析



注: P: 治疗前龈沟液样本; W1: 治疗后1周龈沟液样本; W2: 治疗后2周龈沟液样本; W4: 治疗后4周龈沟液样本; W12: 治疗后12周龈沟液样本; W24: 治疗后24周龈沟液样本

图10 种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前及治疗后不同时间点龈沟液样本二维主坐标分析

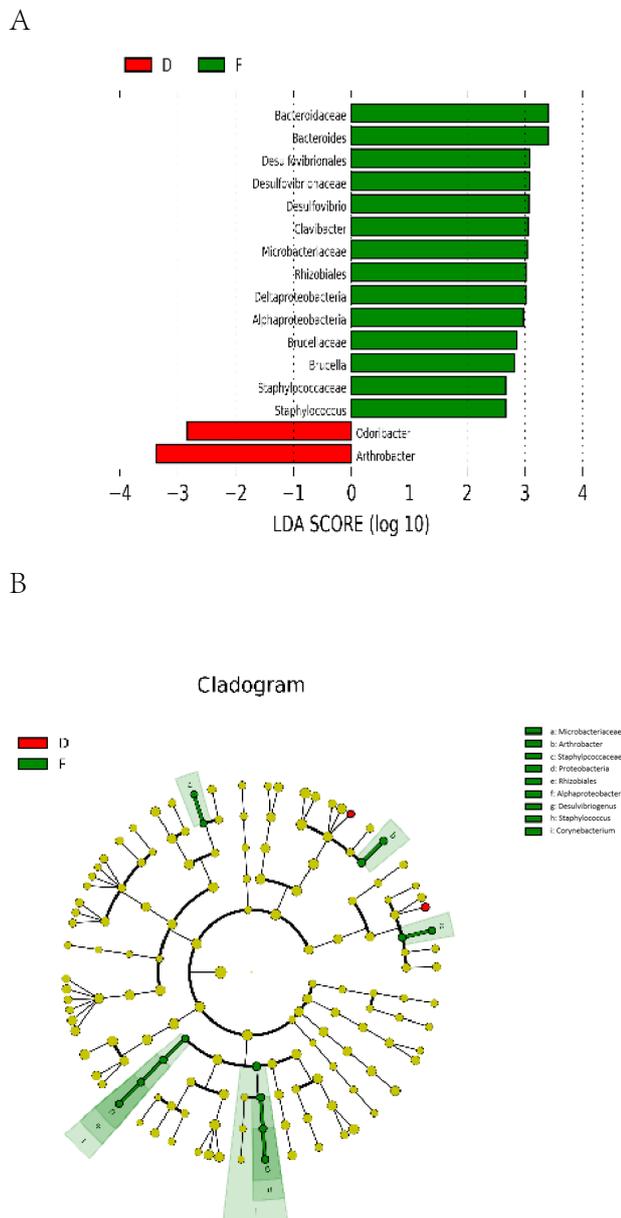
提示治疗后24周与其他组区分明显, 组间两两比较证实治疗后24周与其他5组β多样性均有显著性差异 (P: $\chi^2 = 7.751$ 、 $P = 0.005$; W1: $\chi^2 = 6.471$ 、 $P = 0.011$; W2: $\chi^2 = 4.997$ 、 $P = 0.025$; W4: $\chi^2 = 3.612$ 、 $P = 0.0415$; W12: $\chi^2 = 3.125$ 、 $P = 0.0486$), 提示在不考虑丰度信息下, 治疗后24周群落的多样性与前组显著不同。

五、物种组间差异分析

研究进一步分析各组间丰度有显著性差异的物种, 经Kruskal多组间检验, 各组在门和纲水平差异无统计学意义; 在目的分类水平上, 脱硫弧菌目、红杆菌目及丹毒丝菌目有显著差异 (经FDR校正后 P 均 < 0.05), 皆为低丰度菌目, 经Wilcox两两比较显示, 治疗后24周脱硫弧菌目、红杆菌目及丹毒丝菌显著高于治疗前 ($\chi^2 = 16.234$ 、 $P < 0.001$, $\chi^2 = 9.328$ 、 $P = 0.001$, $\chi^2 = 42.160$ 、 $P < 0.001$)。在科水平上, 理研菌科、脱硫弧菌科、短杆菌科、布鲁菌科、红杆菌科及丹毒丝菌科差异有统计学意义 (经FDR校正后 P 值均 < 0.05), 皆为低丰度菌科; 经Wilcox两两比较显示, 治疗后24周理研菌科、脱硫弧菌科、短杆菌科、布鲁菌科、丹毒丝菌科、瘤胃球菌科及红杆菌科显著高于治疗前 (经FDR校正后 P 值均 < 0.05)。在属水平上, 异花草属、Sporobacter、Acetatifactor、阿利斯佩斯属、棒状杆菌属、脱硫弧菌属、副球菌属、短杆菌属、布鲁氏菌属、Flavonifactor、Oscillibacter、副细菌属及梭状芽孢杆菌_XIVa属, 差异有统计学意义 (经FDR校正后 P 值均 < 0.05), 皆为低丰度菌属, 经Wilcox两两比较显示, 治疗后24周异花草属、Sporobacter、Acetatifactor、阿利斯佩斯属、棒状杆菌属、脱硫弧菌属、副球菌属、短杆菌属、布鲁菌属、Flavonifactor、Oscillibacter、Akkermansia、Romboutsia、臭味杆菌属、副细菌属、梭状芽孢杆菌_XIVa属、梭状芽孢杆菌_XVIII属及巴氏杆菌属显著高于治疗前 (经FDR校正后 P 值均 < 0.05)。

六、LEfSe分析

为确定不同组间具有显著差异且有生物学相关意义的菌群, 应用LEfSe分析比较治疗前患者和治疗后不同时间患者的GCF菌群组成。LEfSe分析总共显示16个不同的特征菌群 (图11) 包括拟杆菌科、拟杆菌属、脱硫弧菌目、脱硫弧菌科、脱硫弧菌属、棒状杆菌属、微杆菌科、根瘤菌目、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲、布鲁氏菌科、布鲁菌属、葡萄球菌科、葡萄球菌属、臭杆菌属及节杆菌属。



注: A: 物种LEfSe分析柱状图; B: 进化分支图。LEfSe鉴定了治疗前后不同时间点丰度差异起主要生物学作用的菌群(LDA>2)。D: 治疗后4周, F: 治疗后24周

图11 物种LEfSe分析柱状图及进化分支图

讨 论

种植体周围炎是一类由于微生物感染引发的疾病, 引发种植体周围炎症反应的细菌可能迁移自口腔其他部位, 种植体周围炎可能影响周围组织并影响种植体的骨结合。既往有研究通过使用16S rRNA基因克隆建库技术对种植体周围炎细菌组成进行分析后指出, 种植体周围炎细菌群落成分较牙周炎更为复杂^[19]。然而, 口腔微生物群是由数百种

常见的细菌群落组成的复杂而平衡的系统, 维持一个相对平衡的微生态环境可能比单纯细菌的清除更为重要。相对于其他的非手术方式, 辅助光动力治疗可能对种植体周围的微生物环境起到调节的作用, 故较传统单纯菌斑清除方式更具有优势。本研究通过使用高通量测序技术获取种植体周围炎相关的细菌群落信息, 对种植体周围炎微生物群落的生态情况进行分析和探讨。

本研究共获得4 092 109个高质量序列, 最终从67个样本中获得1 205个OTU, 测序数据有足够的测序深度, 带有平台期的稀释曲线亦表明测序覆盖度较好。本研究结果表明, 所有受试者的主要优势菌属包括奈瑟菌属、梭杆菌属、嗜血杆菌属、普氏菌属、链球菌属、卟啉单胞菌属、密螺旋体属、嗜二氧化碳噬细胞菌属、纤毛菌属和弯曲菌属, 其中牙龈卟啉单胞菌、福塞坦菌和齿垢密螺旋体属于牙周红色复合体, 核梭状芽孢杆菌、中间普菌、变黑普菌、微小消化链球菌、结节性真细菌、直弯弯曲菌、showae弯曲杆菌、星群链球菌和纤细弯曲菌属于橙色复合体, 这与先前研究结果一致, 红橙复合体在种植体周围炎患者中丰度较高^[20-21]。

既往研究^[22-24]表明普氏菌属、密螺旋体属、弯曲菌属和卟啉单胞菌属是种植体周围炎的致病菌属。PDT疗法作为一种新兴的治疗技术, 当在正常组织或细胞中外加光敏剂时, 所有组织或细胞都会吸收, 经过一段时间后, 光敏剂会从正常组织中逐渐清除, 但却能留存于病变组织或细菌细胞中, 并能选择性地附着于细菌的膜系统上, 尤其是细胞壁, 而非细胞体内。随后在适当波长激光局部照射后, 光敏剂被激活, 受激活的光敏剂将光能由光化学反应传递给组织或细菌细胞内的物质(如氧), 以产生具有毒性的自由基, 或与组织、细菌细胞内的氧分子作用, 产生一些氧化活性分子(radical oxygenspecies, ROS)并攻击细胞结构, 直接破坏细菌的细胞壁和膜系统, 影响其自身的新陈代谢, 从而导致细菌死亡^[25]。既往研究中, 有报道证实, 在口腔局部环境下使用PDT疗法, 可以有效杀灭口腔致病菌, 包括中间普菌、产黑色杆菌、梭形杆菌、β-溶血性链球菌^[26-27]。本研究比较治疗前后各组间的物种丰度, 这些致病的优势菌在门、纲、目、科、属等层次上均差异无统计学意义, 与以往研究结果不一致, 表明光动力联合龈下喷砂治疗种植体周围炎并未显著降低患者口腔微生物环境内的主要致病菌属。这一现象可能与本研究患者病例数较少, GCF样本干净无脓液血液污染及病原菌的异

质性有关,故需要更多的样本以及更完整的随访进一步研究。最近也有研究表明^[28]在健康种植体处也可检测到普氏菌属、葡萄球菌属、坦纳菌属及密螺旋体属,提示种植体本身的特性,独特的骨结合方式而不具有牙周韧带,种植体周围的胶原纤维通过小血管系统呈环绕方式排列。此外,种植体周围结缔组织的附着较牙周组织更为薄弱,更易于附着厌氧菌,导致常见的致病菌属丰度高,但临床指标未达到诊断种植体周围炎,或可解释本研究中治疗后致病优势菌属未显著减少但临床指标明显改善。此外,本研究发现各组间样本内Chao指数差异有统计学意义,且组间物种的差异分析显示多样性差异多来源于非优势菌群的丰度改变,治疗后24周的低丰度菌群丰度增加;尽管无统计学意义,但治疗后24周样本的香农指数高于治疗前,提示治疗半年后细菌群落成的多样性增加,与以往研究结果一致,健康的种植体群落组成多样性高于种植体周围炎患者^[29]。PDT作为一种冷光化学反应,借助光敏剂在特定波长的光源照射下产生单线态氧和自由基,破坏细菌的细胞壁和膜系统,从而致细菌死亡^[30]。经PDT治疗后口腔菌群再平衡,尽管这些数据不能直接证明PDT联合龈下喷砂疗法可以显著减少种植体周围炎中的主要病原体,但仍然表明该疗法可以在治疗后6个月内增加低丰度菌群的丰度,从而增加了物种多样性。

组间差异分析提示,治疗后24周与治疗前相比,异花草属、Sporobacter、Acetatifactor、阿利斯佩斯属、棒状杆菌属、脱硫弧菌属、副球菌属、短杆菌属、布鲁菌属、Flavonifactor、Oscillibacter、Akkermansia、Romboutsia、臭味杆菌属、副细菌属、梭状芽孢杆菌_XIVa属、梭状芽孢杆菌_XVIII属及巴氏杆菌属显著多于治疗前,LEfSe分析进一步提示拟杆菌属、脱硫弧菌属、棒状杆菌属、布鲁菌属、葡萄球菌属、臭杆菌属及节杆菌属为特征菌属,或在治疗后口腔微生物的再平衡中起到重要作用,需更多的研究进一步支持本论点。其中Akkermansia是革兰阴性细菌,存在于人体胃肠道中。在肥胖和2型糖尿病中通常有阿克曼病的报道,在种植体周围炎中较少见。在某些研究中,阿克曼病可能是炎症改变的原因,棒杆菌属、梭状芽孢杆菌属也可能参与炎症的改变,但是治疗后24周临床指标显著改善的情况下这些菌属丰度增加,提示下一步进行菌群功能研究的重要性。

低丰度菌群丰度的升高对种植体周围炎临床指标的改善有一定作用。种植体周围炎的微生物菌

群相对比较复杂,也并不是只由优势菌群决定了其生物学特性,本研究认为这些低丰度非优势菌群丰度的升高,可以降低种植体周围炎患者的某些临床指标。同时,本研究发现龈沟液炎症因子也有所下降。故推测低丰度菌群丰度升高不仅改善了临床指标,同时,因为低丰度菌群丰度的升高,也抑制了优势菌的某些生物学行为,导致炎症因子水平下降,临床指标也相应下降。这对于种植体周围炎的治疗具有一定价值。

基于二代16S测序的技术限制,菌群组成分析上难以将细菌鉴定至属水平,且获得的是细菌16S部分序列,得到差异菌属后难以得到正确全面的功能性结论,本研究提供了初步启示,除需要更多基于治疗带来的菌群改变的研究外仍需要宏基因组测序来明确更全面的微生物功能上的改变,以进一步明确从治疗到微生物改变,再到微生物的功能影响,有助于更深入认识光动力治疗对种植体周围炎疾病的改善。此外,性别、年龄、吸烟、饮酒、体质质量指数、地域差异、饮食习惯、口腔卫生习惯都可改变口腔菌群,本研究纳入的患者在性别、年龄、吸烟、饮酒、体质质量指数等因素上均衡可比,但患者饮食习惯,卫生习惯均未调查。饮食导致的个体差异较大,比如高蔗糖食物可使变形链球菌、乳杆菌及放线菌增加,基于本研究结果,仍需更全面的患者信息收集,严格的随访质控,更大的样本量以进一步探索。

本研究的局限性包括样本量较小且可能影响GCF菌群的因素,如首次治疗后的药物史和口腔个人护理情况未被调查。因此,仍需要大样本的前瞻性研究佐证本研究观点。研究亮点在于首次从微生物角度阐述了光动力联合龈下喷砂治疗种植体周围炎前后GCF菌群的变化,有助于进一步了解本治疗方式在种植体周围炎患者中的作用。

综上,种植体周围炎患者接受光动力联合龈下喷砂疗法治疗前后的龈沟液菌群组成未发生显著变化,治疗后24周的物种多样性显著高于治疗前,主要体现在非优势菌群增加。为进一步研究该疗法对种植体周围炎在调节局部微生态环境、长期维护过程中发挥的作用提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 吴补领,邵龙泉.老年人牙列缺损及牙列缺失的修复治疗[J].中国实用口腔科杂志,2010,3(2):68-71.
- [2] Dragan IF, Pirc M, Rizea C, et al. A global perspective on implant education: Cluster analysis of the "first dental implant experience" of dentists from 84 nationalities[J]. Eur J Dent Educ,2019,23(3):251-265.

- [3] Amerio E, Mainas G, Petrova D, et al. Compliance with supportive periodontal/peri-implant therapy: A systematic review[J]. *J Clin Periodontol*,2020,47(1):81-100.
- [4] Accioni F, Vázquez J, Merinero M, et al. Latest trends in surface modification for dental implantology: innovative developments and analytical applications[J]. *Pharmaceutics*,2022,14(2):455.
- [5] Ito T, Mori G, Oda Y, et al. Clinical evaluation of periodontal pathogen levels by real-time polymerase chain reaction in peri-implantitis patients[J]. *Int J Implant Dent*,2021,7(1):105.
- [6] Mulla M, Hegde S, Koshy A, et al. Effect of probiotic lactobacillus salivarius on peri-implantitis pathogenic bacteria: an in vitro study[J]. *Cureus*,2021,13(12):e20808.
- [7] Barbagallo G, Santagati M, Guni A, et al. Microbiome differences in periodontal, peri-implant, and healthy sites: a cross-sectional pilot study[J]. *Clin Oral Investig*,2022,26(3):2771-2781.
- [8] Sahrman P, Gilli F, Wiedemeier DB, et al. The microbiome of peri-implantitis: asystematic review and meta-analysis[J]. *Microorganisms*,2020,8(5):661.
- [9] Pallos D, Sousa V, Feres M, et al. Salivary microbial dysbiosis is associated with peri-implantitis: a case-control study in a brazilian population[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2022,11:696432.
- [10] Karatas O, Balci Yuce H, Taskan M M, et al. Histological evaluation of peri-implant mucosal and gingival tissues in peri-implantitis, peri-implant mucositis and periodontitis patients: a cross-sectional clinical study[J]. *Acta Odontol Scand*,2020,78(4):241-249.
- [11] Tolstunov L. Peri-implant disease: Peri-implantitis versus “peri-implantosis”[J]. *J Oral Maxillofac Surg*,2020,78(5):680-681.
- [12] Papolou I, Vagia P, Cakir A, et al. Influence of periodontitis, implant, and prosthesis characteristics on the peri-implant status: a cross-sectional study[J]. *Int J Dent*,2022,2022:9984871.
- [13] Ting M, Alluri LSC, Sulewski JG, et al. Laser treatment of peri-implantitis: A systematic review of radiographic outcomes[J]. *Dent J (Basel)*,2022,10(2):20.
- [14] Wang H, Liu Y, Li W, et al. Microbiota in gingival crevicular fluid before and after mechanical debridement with antimicrobial photodynamic therapy in peri-implantitis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2022,11:777627.
- [15] Zhao Y, Pu R, Qian Y, et al. Antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*,2021,34:102231.
- [16] Varon E, Blumrosen G, Sinvani M, et al. An engineered nanocomplex with photodynamic and photothermal synergistic properties for cancer treatment[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(4):2286.
- [17] Misischia WP, Xenoudi P, Yukna RA, et al. Bacterial reduction effect of four different dental lasers on titanium surfaces in vitro[J]. *Lasers Med Sci*,2021,36(8):1759-1767.
- [18] Cai Z, Li Y, Wang Y, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*,2019,25:382-388.
- [19] Polymeri A, van der Horst J, Buijs MJ, et al. Submucosal microbiome of peri-implant sites: A cross-sectional study[J]. *J Clin Periodontol*, 2021,48(9):1228-1239..
- [20] Nie J, Zhang Q, Zheng H, et al. Pyrosequencing of the subgingival microbiome in peri-implantitis after non-surgical mechanical debridement therapy[J]. *J Periodontol Res*,2020,55(2):238-246.
- [21] Jiang Q, Huang X, Yu W, et al. mTOR signaling in the regulation of CD4⁺ T cell subsets in periodontal diseases[J]. *Front Immunol*,2022,13:827461.
- [22] Komatsu K, Shiba T, Takeuchi Y, et al. Discriminating microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis with integrated metagenomic, metatranscriptomic, and network analysis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2020,10:596490.
- [23] Elnagdy S, Raptopoulos M, Kormas I, et al. Local oral delivery agents with anti-biofilm properties for the treatment of periodontitis and peri-implantitis. anarrative review[J]. *Molecules*,2021,26(18):5661.
- [24] de Avila ED, van Oirschot BA, van den Beucken JJJP. Biomaterial-based possibilities for managing peri-implantitis[J]. *J Periodontol Res*,2020,55(2):165-173.
- [25] Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations[J]. *Biomed Pharmacother*,2018,106:1098-1107.
- [26] Rocca JP, Fornaini C, Wang Z, et al. Focal infection and periodontitis: anarrative report and new possible approaches[J]. *Int J Microbiol*,2020,2020:8875612.
- [27] Hosseinpour S, Nanda A, Walsh LJ, et al. Microbial decontamination and antibacterial activity of nanostructured titanium dental implants: anarrative review[J]. *Nanomaterials (Basel)*,2021,11(9):2336.
- [28] Ghensi P, Manghi P, Zolfo M, et al. Strong oral plaque microbiome signatures for dental implant diseases identified by strain-resolution metagenomics[J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*,2020,6(1):47.
- [29] Al-Marzooq F, Al Kawas S, Rahman B, et al. Supragingival microbiome alternations as a consequence of smoking different tobacco types and its relation to dental caries[J]. *Sci Rep*,2022,12(1):2861.
- [30] Tavares LJ, Pavarina AC, Vergani CE, et al. The impact of antimicrobial photodynamic therapy on peri-implant disease: What mechanisms are involved in this novel treatment?[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*,2017,17:236-244.

(收稿日期: 2022-03-01)

(本文编辑: 孙荣华)

王海燕, 张冬雪, 粟申平, 等. 光动力联合龈下喷砂疗法对种植体周围炎龈沟液菌群分布改变的疗效 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2022,16(6):391-403.