

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.030.html>

◇技术与方法◇

特异性抗 *P. g* -IgY 龈下冲洗液 对中度和重度慢性牙周炎的疗效观察

孙晓瑜¹ 徐燕¹ 张雷¹ 李为¹ 洪彪¹ 周永敏¹ 孟明理¹ 程婷² 周乐春²

摘要 选择 60 例中重度慢性牙周炎患者,用特异性抗 *P. g*-IgY 龈下冲洗液前后,观察牙周临床指标变化,通过 BANA 实验评价患者口腔各部位牙周致病菌含量的变化。用药后附着丧失、松动度、探诊出血百分比、菌斑占有率、深牙周袋比例均减小且以抗 *P. g*-IgY 龈下冲洗液组改善效果最为显著。BANA 实验结果表明该龈下冲洗液可显著减少牙周袋和唾液中的牙周致病菌。特异性抗 *P. g*-IgY 龈下冲洗液临床疗效好,可作为中重度慢性牙周炎的辅助治疗手段,有较高的临床推广价值。

关键词 牙周炎; IgY; 西吡氯铵

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1846-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.030

牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*) 是与慢性牙周炎的关系最为密切的牙周致病菌,在慢性牙周炎患者的龈下菌斑中检出率可高达 98.15%^[1],与多种系统性疾病的发生发展均存在相关性^[2]。近年来,随着对细菌结构和作用机制的深入了解,采用免疫学的方法控制感染为解决这一难题提供了新的思路和方法。卵黄抗体 (egg yolk immunoglobulin, IgY) 是一种经特异性抗原免疫禽类 (如产蛋母鸡) 后所产生的保护性血清抗体,这种抗体可不断浓缩储存至卵黄并以产蛋的方式遗传给子代,为子代提供免疫防护^[3-4]。本课题组前期将 *P. g* 作为抗原免疫产蛋母鸡,从鸡蛋中纯化提取了特异性的抗 *P. g*-IgY 抗体^[5-6] 配制成漱口水用于口腔含漱和龈下冲洗。该实验从门诊就诊的患者中随机

选取诊断为中重度慢性牙周炎的患者 60 例进行临床观察,以此评价该龈下冲洗液的临床疗效。

1 材料与方法

1.1 药品及用法

1.1.1 药品 试验药为与安徽安科生物工程(集团)股份有限公司合作生产的抗 *P. g*-IgY 漱口水,抗体滴度为 1:1 280,商品名:安漱净。阳性对照组用药为杭州民生药业有限公司生产的西吡氯铵含漱液,含 0.1% 西吡氯铵。阴性对照组为安徽安科生物工程(集团)股份有限公司提供的不含药物成分仅有安漱净辅料成分的溶媒,辅料成分包括水、甘油、山梨醇、柠檬酸和柠檬酸钠。

1.1.2 药品发放及用法 按照单盲、随机平行对照原则使用计算机软件将患者编号进行分组,共分成 3 组,每组 20 例,编号 1~60。患者按就诊的先后顺序获得编号并根据编号领取相应的药品。嘱患者每周到医院复诊 1 次,由接诊医师对患者全口牙周袋行药物冲洗,7 d 为 1 个疗程,实验周期 4 周,共冲洗 4 次。

1.2 病例纳入和排除标准 纳入标准:男女均可,年龄 18~65(43.26±2.15)岁,诊断为中度或重度慢性牙周炎者;1 个月内未接受任何药物治疗;3 个月内未接受任何牙周治疗;无系统性疾病、肝肾功能异常及血常规、血小板和出凝血时间异常者;均知情同意,自愿参加。排除标准:孕期及哺乳期妇女;有严重全身重要脏器疾病、精神性疾病患者;有药物过敏史的患者;口内有正畸装置者;指数牙缺失者;治疗期间同时使用其他抗菌药物或者中断治疗者;不能合作或不能定期复诊者。

1.3 实验流程设计 患者首次就诊当天进行基线检查,常规行基础治疗(龈上洁治术和龈下刮治术)和口腔卫生宣教。基础治疗结束后将药品发放给患者,要求患者按药品使用方法含漱,保持日常饮食习惯及口腔卫生保健措施,统一使用不含药物的牙膏。

2016-07-19 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MK128);安徽医科大学校级科研基金(编号:2012xkj020);安徽医科大学横向联合课题(编号:K2015011)

作者单位:安徽医科大学附属口腔医院,合肥 230032

作者简介:孙晓瑜,女,主治医师;

徐燕,女,教授,主任医师,责任作者,E-mail:173236344@qq.com

基础治疗结束次日开始使用药物,首次使用药物当天记为第1天,第28天行终点检查,记录实验数据。统计分析时选取患者的6颗指数牙进行数据分析,这6颗指数牙分别为16、11、26、36、31、46,每个牙位测量6个位点。

1.4 观察指标

1.4.1 自觉症状指标 检查牙龈有无红肿、出血、疼痛,是否有口臭及严重程度,以及是否有咬合不适及严重程度。

1.4.2 临床指标 记录实验数据采集牙位的附着丧失(attachment loss, AL)和松动度(mobility, MOB)、全口探诊出血(bleeding on probing, BOP)阳性率、菌斑占有率(plaque index, PLI)和深牙周袋比例,以上各临床指标数据均来自佛罗里达探针检查结果。

1.4.3 细菌学鉴定 细菌样本分别从龈下菌斑、唾液和龈沟液中进行采样获得,苯甲酰精氨酸萘酰胺(BANA)实验检测不同来源的样本中牙周主要致病菌红色复合体细菌含量的变化。

菌斑样本取样:选择基线检查时牙周检查指标最严重的位点在治疗前、中期、治疗结束后取样,用无菌刮治器探入龈袋或牙周袋袋底,轻轻刮取牙面少量菌斑,置于盛有0.5 ml PBS的试管中备用。

唾液样本取样:让受试者清水漱口2 min,采集其自然排出的非刺激性唾液0.5~1 ml,在漩涡振荡器中震荡10~20 s,分散细菌团块后备用。

龈沟液样本取样:让受试者先用清水漱口2 min,将3M Waterman 1#滤纸条裁剪成宽2 mm、长1 cm的细条状,将滤纸条轻轻插入牙周检查指标最严重位点的牙周袋内放置1 min后取出,放置于盛有0.5 ml PBS的试管中备用。

BANA实验方法:取1 mmol/L的BANA 100 μ l加入酶联反应板孔内,然后加入100 μ l菌液样本,37 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日在板内加入0.2% 坚牢黑K盐50 μ l呈色5 min后观察结果^[7]。实验结果蓝色

为阳性,灰色为弱阳性,橙红色为阴性。然后测定样本600 nm波长的吸光度(absorbance, A)值^[8]。通过计算各组治疗前后的阳性率及测量 $A_{600\text{ nm}}$ 值判断BANA实验结果:其中 $A < 0.2$ 为阴性, $0.2 < A < 0.6$ 为弱阳性, $A > 0.6$ 为阳性;弱阳性和阳性结果均计为阳性。

1.4.4 不良反应 观察受试者在治疗和用药期间有无过敏、刺激性反应、味觉改变、呕吐不适等不良反应出现,并记录。

1.5 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,计数资料以中位数(下四分位数,上四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 描述。每一组用药前后各项临床检查指标间的纵向比较用方差分析,MOB治疗前后的比较采用 χ^2 检验;实验组和对照组组间有效性的比较用Ridit分析;实验组和对照组两组间临床检查指标的横向比较用配对 t 检验;BANA实验治疗前后的组内比较采用两相关样本非参数检验,组间比较采用多组秩和检验。

2 结果

2.1 受试者一般情况 本实验共纳入符合条件的患者67例,失访7例,去除失访患者,实际入组人数为60例。在整个用药期间,仅有西吡氯铵组出现了1例用药后黏膜不适的不良反应,其他各组均无明显不适。

2.2 临床指标 AL在3组术后均减小,治疗前后差异有统计学意义($P < 0.05$);组间比较,第1组与第2、3两组比较对于AL的疗效差异有统计学意义($F = 3.753, P < 0.001$),说明第1组对AL的改善作用优于第2组、第3组;BOP阳性率除第3组以外,其余两组治疗前后差异有统计学意义($P < 0.05$);MOB、PLI、深牙周袋比例在治疗前后差异均有统计学意义($P < 0.05$),但以上4个指标在组间比较差异无统计学意义。见表1、2。

2.3 细菌学指标 结果表明从牙周袋内和龈沟液

表1 3组间治疗前后AL、BOP阳性率、PLI和深牙周袋比例($\bar{x} \pm s$)

指标	第1组		t 值	P 值	第2组		t 值	P 值	第3组		t 值	P 值
	治疗前	治疗后			治疗前	治疗后			治疗前	治疗后		
AL(mm)	4.61 \pm 1.87	3.77 \pm 1.84	13.5	0.00	4.48 \pm 1.94	3.73 \pm 2.05	10.24	0.00	4.52 \pm 1.88	3.86 \pm 1.75	11.39	0.00
BOP	0.56 \pm 0.24	0.18 \pm 0.08	6.55	0.00	0.55 \pm 0.26	0.18 \pm 0.10	6.68	0.00	0.5 \pm 0.23	0.88 \pm 3.08	-0.55	0.59
PLI	0.87 \pm 0.13	0.55 \pm 0.22	5.21	0.00	0.78 \pm 0.26	0.48 \pm 0.18	4.12	0.00	0.8 \pm 0.21	0.61 \pm 0.25	2.57	0.14
深牙周袋比例	0.47 \pm 0.17	0.23 \pm 0.14	4.79	0.00	0.49 \pm 0.15	0.27 \pm 0.14	4.69	0.00	0.52 \pm 0.2	0.32 \pm 0.13	3.74	0.01

表2 3组 MOB 等级的比较(颗)

项目	0°	I°	II°	III°	χ ² 值	P 值
第1组					30.53	<0.05
治疗前	74	34	3	3		
治疗后	90	15	7	2		
第2组					27.92	<0.05
治疗前	76	22	4	0		
治疗后	85	13	3	1		
第3组					51.86	<0.05
治疗前	79	29	5	1		
治疗后	87	22	4	1		

中检出牙周致病菌的阳性率均下降,从唾液中检出的阳性率只有第1组是下降的,第2组无变化,第3组升高。见图1~3。具体分析每个采样位点600nm的A值结果显示,从牙周袋内采样的细菌,3组术前术后差异均有统计学意义,且术后均小于术前,

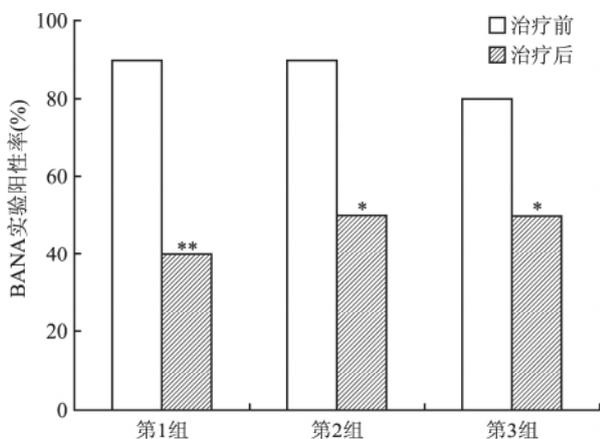


图1 治疗前后牙周袋内样本的 BANA 阳性率比较
与治疗前比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

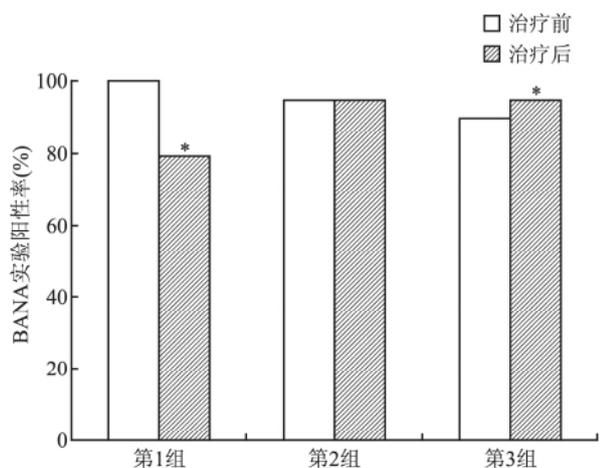


图2 治疗前后唾液样本的 BANA 阳性率比较
与治疗前比较: * P < 0.05

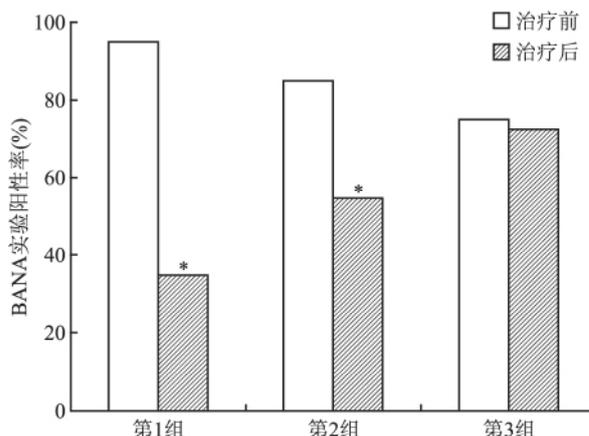


图3 治疗前后龈沟液样本的 BANA 阳性率比较
与治疗前比较: * P < 0.05

3组间差异有统计学意义(P < 0.05),以第1组效果最显著。龈沟液处采样的结果表明第1、2组术后均小于术前,第3组术前术后差异无统计学意义,3组间差异无统计学意义。从唾液中获得的细菌样本,结果表明第1组术后小于术前,第3组术后大于术前,第2组术前术后差异无统计学意义,组间差异有统计学意义(P < 0.05),见表3。BANA实验结果表明使用抗P. g-IgY龈下冲洗液治疗可有效控制口腔环境中红色复合体的细菌含量。

3 讨论

牙周病的治疗主要通过机械治疗和药物治疗等方法控制炎症,常规的洁刮治和翻瓣术可以去除大部分的菌斑、牙石;但是对于中重度牙周炎患者,由于深牙周袋和根面结构的复杂性,器械难以达到感染的最深处,在清创的同时还需要使用抗菌药物作为补充治疗,阻止细菌在牙周袋内再定植,预防疾病复发^[9]。目前临床用药种类以抗生素类为主,复方氯己定含漱液、浓替硝唑含漱液等局部用药往往也含有较高浓度的抗生素成分,此类药物长期使用易诱发细菌耐药、造成口腔菌群失调,严重者导致肝、肾功能损伤及耳聋、耳鸣、四环素牙等严重后果。因此寻求一种抗生素的替代药物,既能有效治疗疾病又能避免抗生素的各种弊端。

采用被动免疫方式通过人工方法直接向机体输入免疫效应物为疾病的治疗提供新的解决途径。卵黄抗体IgY的来源广泛、性质稳定、安全无毒副作用,且被动免疫产生作用快,与抗生素相比不会产生耐药性。本次临床研究结果表明在基础治疗后使用

表3 BANA 法测定各组治疗前后 A_{600 nm} 值 [M(P₂₅ P₇₅)]

采样部位	第 1 组		第 2 组		第 3 组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
牙周袋	1.67(0.83 2.60)	0.59(0.45 0.82)	1.63(0.99 2.50)	0.59(0.45 0.82)	1.06(0.61 1.89)	0.58(0.45 1.02)
唾液	1.14(0.86 1.56)	0.81(0.70 1.02)	1.09(0.87 1.46)	0.99(0.73 1.63)	1.19(0.97 1.72)	0.84(0.68 1.13)
龈沟液	0.89(0.67 1.53)	0.55(0.43 0.70)	0.97(0.70 1.80)	0.81(0.46 1.72)	0.75(0.56 1.20)	0.57(0.40 0.73)

特异性抗 *P. g-IgY* 的龈下冲洗液患者牙周袋内、龈沟液及唾液环境中的细菌尤其是红色微生物复合体得到了更为显著的抑制。将这一类产品作为牙周基础治疗后的补充治疗手段,在辅助控制牙周细菌感染的同时也有效规避了传统的漱口液易引起口腔细菌耐药的风险。除此以外,特异性抗 *P. g-IgY* 龈下冲洗液口感更加温和舒适,避免引起患者黏膜不适以及味觉改变,更适用于作为牙周炎患者治疗后的长期维护、妊娠期哺乳期妇女和健康人群的日常保健。

由于被动免疫中抗原抗体的结合反应是迅速发生的,用药后的远期临床疗效仍有待进一步观察,各种类型的牙周致病菌在菌斑中构成比例如何发生变化,以及被动免疫抗体杀菌具体的作用机制有待进一步的研究。

参考文献

[1] 周婷,徐屹,丁一等.慢性牙周炎龈下菌斑中五种牙周可疑致病微生物的分布[J].华西口腔医学杂志 2007 25(5):

470-3.

- [2] Zanella S M ,Pereira S S ,Barbisan J N ,et al. Periodontal disease , tooth loss and coronary heart disease assessed by coronary angiography: a cross-sectional observational study [J]. Periodont Res , 2016 51(2) : 221 - 7.
- [3] Fujibayashi T , Nakamura M , Tominaga A , et al. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida spp.* adherence and biofilm formation [J]. Jpn J Infect Dis , 2009 , 62(5) : 337 - 42.
- [4] Spillner E , Braren I , Greunke K , et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research , diagnostics and therapy [J]. Biologicals 2012 40(5) : 313 - 22.
- [5] 姜大川,徐燕,孙晓瑜,等.抗牙龈卟啉单胞菌 IgY 的制备和鉴定[J].中华口腔医学杂志 2011 46(10) : 586 - 9.
- [6] 孙晓瑜,徐燕,王婉,等.被动免疫制剂抗 *P. g-IgY* 对大鼠实验性牙周炎的治疗[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2011,7(7) : 380 - 5.
- [7] 闫文娟,薛毅,李向飞,等.改良固相 BANA 试验方法的建立[J].牙体牙髓牙周病学杂志 2007 17(7) : 394 - 7.
- [8] 信玉华,薛毅,唐涛,等.血液因素对龈下菌斑 BANA 试验结果的影响[J].中国微生态学杂志 2006 18(5) : 367 - 8.
- [9] 姜大川,徐燕,窦晓晨,等.新型牙周制剂治疗慢性牙周炎的临床观察[J].安徽医科大学学报 2010 45(5) : 671 - 3.

Effects of anti-*P. g-IgY* on the treatment of moderate or severe periodontitis

Sun Xiaoyu , Xu Yan , Zhang Lei , et al

(Stomatologic Hospital & College Anhui Medical University ,

Key Lab. of Oral Disease Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract To investigate the clinical parameters changes after using specific anti-*P. g-IgY* subgingival fluid. Sixty moderate or severe chronic periodontitis patients were chosen. The periodontal pathogens content changes and periodontal bacteria levels were calculated by BANA test. After statistical analysis , all the clinical parameters were significantly different between before and after investigation , and anti *P. g-IgY* subgingival fluid group had the most significant effect. BANA test results showed that the subgingival fluid could significantly reduce the periodontal pathogens in the periodontal pocket and saliva. Specific anti *P. g-IgY* subgingival liquid is a high clinical value method and it can be used as adjunctive treatment of moderate to severe chronic periodontitis.

Key words periodontitis; IgY; cetylpyridinium chloride