

文章编号: 0258-7025(2009)10-2700-05

光动力疗法对人工龋口腔生物膜菌斑的影响

邹朝晖¹ 高平¹ 阴慧娟² 李迎新²

(¹ 天津医科大学口腔医院, 天津 300070
² 天津医科大学生物医学工程系, 天津 300070)

摘要 为探讨光动力疗法(PDT)对人工龋菌斑生物膜的作用,选用变形链球菌在体外构建符合人体生理环境的人工龋模型,选择血卟啉单甲醚(HMME)为光敏剂,激光照射选用半导体激光器,波长为635 nm,输出功率为10 mW,能量密度为12.47 J/cm²。用50个釉质块形成人工龋模型,随机分成5组,每组10块,分别为:1) HMME组;2) 激光照射组;3) PDT防龋组;4) 0.05%(质量分数)洗必泰处理组为阳性对照;5) 0.9%(质量分数)生理盐水处理组为阴性对照。依照平板细菌计数法观察不同处理方法对人工龋菌斑生物膜变形链球菌活力的影响。结果表明,与阴性对照组相比,HMME组人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量(CFU/mL)无显著性差异($P>0.05$),杀菌率仅为0.05%;激光照射和0.05%洗必泰均能使人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量显著减少($P<0.05$),杀菌率分别为59.94%和58.52%;而PDT防龋处理可使人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量更为显著减少($P<0.05$),杀菌率高达99.36%。HMME-PDT可有效杀灭人工龋口腔生物膜中的变形链球菌,为预防龋病提供了一种有效的新途径。

关键词 光动力疗法; 口腔生物膜; 龋齿; 光敏剂; 单态氧

中图分类号 R318 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093610.2700

Influence of Photodynamic Therapy on Dental Plaque of Oral Biofilm of Artificial Dental Caries

Zou Zhaohui¹ Gao Ping¹ Yin Huijuan² Li Yingxin²

(¹ Dental Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
² Department of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract To discuss the effects of photodynamic therapy (PDT) on the mainly oral cariogenic biofilm bacteria, an artificial caries model was built consistent with the physiological environment with streptococcus mutans. Hematoporphyrin monomethyl ether was selected for photosensitizer. 635 nm diode laser was used for irradiation, with delivered power 10 mW and energy density 12.47 J/cm². Fifty enamel blocks were formed artificial caries models. Separated them into five groups random, ten blocks each group: 1) Group of HMME; 2) Group of laser; 3) Group of PDT; 4) Positive control group of 0.05% chlorhexidine; and 5) Negative control group of 0.9% saline. The influence of on dental plaque oral biofilm of artificial dental caries was observed according to plate counting of bacteria method. Compared to negative control group, the number of streptococcus mutans (CFU/mL) of oral biofilm in artificial caries model of HMME group was not significant different ($P>0.05$), with the bactericidal rate only 0.05%; laser irradiation and 0.05% chlorhexidine made the number of streptococcus mutans of oral biofilm in artificial caries model significantly reduced ($P<0.05$), with the bactericidal rate 59.94% and 58.52% separately; after PDT treatment against dental caries, the number of streptococcus mutans of oral biofilm in artificial caries model significantly reduced ($P<0.05$), the bactericidal rate up to 99.36%. HMME-PDT is an effective method in eliminate streptococcus mutans of oral biofilm for artificial caries model. It provides an new effective approach for dental caries prevention.

Key words photodynamic therapy; oral biofilm; dental caries; photosensitizer; singlet oxygen

收稿日期: 2009-07-09; 收到修改稿日期: 2009-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(60678047)资助项目。

作者简介: 邹朝晖(1968—), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事激光口腔医学方面的研究。E-mail: zouzhaohui2005@sina.com

导师简介: 李迎新(1959—), 男, 博士, 教授, 主要从事激光医学方面的研究。E-mail: yingxinli@tjmu.edu.cn(通信联系人)

1 引言

龋病(dental caries)是多因素作用下由口腔常在菌引起的内源性感染性疾病,世界卫生组织把龋病列为危害人类健康的第三类疾病,它仅次于心血管疾病、肿瘤对健康的危害。牙菌斑(dental plaque)在口腔生物膜内的产酸代谢活动是产生龋病的直接原因,细菌代谢产生乳酸和其他有机酸,可造成牙釉质溶解,矿物质丧失,龋损形成。口腔生物膜(oral biofilm)是唾液蛋白或糖蛋白吸附至牙面所形成的生物膜,是牙菌斑形成和发育的重要基础和内环境^[1]。因此,通过适当方法影响口腔生物膜内的细菌代谢,干扰牙菌斑的形成或促进牙菌斑的分离,即可达到预防龋病的目的。建立人工龋模型是一种常用的龋病研究的科学方法。

光动力疗法(PDT)可有效治疗口腔细菌性疾病而不产生耐药性^[2],因而在消除龋病和牙周病中的口腔致病菌的作用方面具有独特的优势。国外已有学者应用 PDT 方法作用于体外游离于培养基中的变形链球菌,取得了良好的抑菌效果^[3]。PDT 过程中,光敏剂的应用、激光的照射以及单态氧的产生都有可能对菌斑生物膜产生影响,本研究目的在于探讨 PDT 对人工龋菌斑生物膜的影响。

2 材料与方法

2.1 实验菌株、培养基

选择变形链球菌(*S. mutans* Ingbritt 国际参考株,血清型 C, ATCC 25175, 中国科学院北京菌种保藏中心)为主要致龋菌。

液体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB 培养基, 中国检验检疫科学研究院)。固体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基(TSA 培养基, 中国检验检疫科学研究院)。

实验用主要仪器包括:紫外分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU), pH 计(PB-10, Sartorius), 低速离心机(LD5-2B, 北京), 针式滤器(Biofil, 孔隙 0.22 μm , 最大压力 450 kPa), 培养箱(THERMD 型), 净化工作台(VS-1300U 型, 苏州净化设备厂), 激光功率计(LIM-3 型, 中国计量科学研究院)。

2.2 光动力反应光敏剂、激光器

光敏剂:选择血卟啉单甲醚(Hematoporyrin monomethyl Ether, HMME, 上海复旦张江生物制药有限公司)为光敏剂。

激光器:激光照射选用半导体激光器(天津医科

大学激光医学实验室), 波长为 635 nm, 输出功率为 10 mW。

2.3 人工龋模型制备

2.3.1 细菌的复苏与增菌

将 *S. mutans* Ingbritt 菌种于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下(100 mL/L CO_2 , 900 mL/L N_2)复苏 48 h 后, 接种于 TSB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下增菌培养 18~24 h, 涂片检查为纯培养后将菌悬液转入离心管, 室温下 2500 r/m 离心 15 min, 收集细菌。用 KCl 缓冲液洗菌 2 次, 悬浮于含 5 mg/mL BSA 的 KCl 缓冲液中。使用紫外分光光度计测定菌悬液浓度, $\lambda=540\text{ nm}$, $A=1$ 。将菌悬液浓度调至 1×10^8 CFU/mL 备用。

2.3.2 全唾液的收集

选择无龋齿、无牙周病的志愿者, 收集早饭后 2 h 经石蜡刺激的自然混合的全唾液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 g 离心 10 min, 上清液用针式滤器过滤除菌, 用 PBS 调整 pH 至 7.2。经唾液培养无菌生长后, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.3.3 釉质块的制备

收集正畸减数拔除的年轻前磨牙, 选择完整无龋、无斑、无裂纹的牙清洗干净。将新鲜正畸减数牙经 PBS 超声清洗 5 min。将 50 个前磨牙截根保留牙冠部分, 纵劈形成颊面釉质块 50 块, 以颊面釉质为开窗区, 约 4 mm \times 4 mm, 其余区域涂一层指甲油使其完全封闭。釉质块经乙醇消毒 24 h。

2.3.4 唾液获得性膜的形成

将消毒好的釉质块置入全唾液中 37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h, 使釉质块上形成唾液获得性膜。随机分为 2 组, 每组 10 块。

2.3.5 人工龋形成

将已形成唾液获得性膜的 50 块釉质块分别置入含 TSB 培养液 1 mL, 菌液 0.2 mL 的试管中。37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养, 每 48 h 更换一次培养液和细菌, 共孵育 30 天。

2.4 实验分组

将上述 50 个釉质块随机分成 5 组, 每组 10 个。分别处理为:

第 1 组: 单纯 HMME 组。HMME 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 48 h 更换培养液和细菌时孵育时间 2 h。

第 2 组: 单纯激光组。10 mW 半导体激光照射 90 s, 光斑半径 0.15 cm, 能量密度为 12.74 J/cm², 于 48 h 更换培养液和细菌时照射。

第 3 组: PDT 防龋组。HMME 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 孵

育时间2 h;10 mW半导体激光照射90 s,光斑半径0.15 cm,能量密度为12.74 J/cm²,于48 h更换培养液和细菌时 PDT 处理。

第4组:阳性对照组为洗必泰处理组,于48 h更换培养液和细菌时,应用0.05%的洗必泰1 mL处理釉质块90 s。

第5组:阴性对照组为生理盐水处理组,于48 h更换培养液和细菌时,应用0.9%的生理盐水1 mL处理釉质块90 s。

2.5 PDT 对人工龋菌斑生物膜变形链球菌活力的影响实验

依照平板细菌计数法观察 1.4 节中 5 种处理方

表 1 PDT 对人工龋菌斑生物膜变形链球菌活力的影响

Table 1 Influence of PDT to streptococcus mutans on dental plaque of oral biofilm of artificial dental caries

Groups	Method	CFU/mL ($\bar{X} \pm SD$)	Bactericidal rate	Sample size	P
1	HMME	146.5 ± 6.72	0.05%	10	0.1435
2	Laser	63.2 ± 4.32*	59.94%*	10	4.06 × 10 ⁻³⁸
3	PDT	0.6 ± 0.70*	99.36%*	10	1.26 × 10 ⁻⁴⁸
4	Chlorhexidine	66.4 ± 3.53*	58.52%*	10	2.13 × 10 ⁻³⁷
5	Saline	149.5 ± 4.97	0	10	

* There were significant different compared with saline group ($P < 0.05$). $F = 1956.71$.

采用 SPSS15.0 统计分析软件处理实验数据。所得数据以均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示,差异显著性检验用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。结果如图 1 所示,各实验组所采用的不同处理方式中,单纯 HMME 处理与 0.9% 生理盐水阴性对照组相比,人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量 (CFU/mL) 无显著性差异 ($P > 0.05$),杀菌率为 0.05%;单纯激光照射和 0.05% 洗必泰与 0.9% 生理盐水阴性对照组相比,均能使人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量 (CFU/mL) 显著减少 ($P < 0.05$),杀菌率分别为 59.94% 和 58.52%,激光照射

法对人工龋菌斑生物膜变形链球菌活力的影响;5 组釉质块经处理后,取出釉质块,加入 1 mL 质量分数为 0.9% 的生理盐水,旋涡震荡器混旋 2 min,将混旋液梯度稀释至 10⁻⁵,取 100 μL 均匀涂布于 TSA 平皿上,37 °C 厌氧培养 48 h,计数平皿上的菌落数量,每个样本重复 3 次,取平均值。

3 结 果

本实验观察单纯光敏剂处理、单纯激光照射和 PDT 处理对人工龋口腔生物膜中变形链球菌活力的影响,并与洗必泰处理组和生理盐水处理组相比较,结果如表 1 所示。

组略高于洗必泰组,但二者间无显著性差异 ($P > 0.05$);而 PDT 防龋处理组无论是与 0.9% 生理盐水阴性对照组相比,还是与单纯 HMME,单纯激光照射和 0.05% 洗必泰处理组相比,均可使人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量 (CFU/mL) 显著减少 ($P < 0.05$),杀菌率可达 99.36%。

4 讨 论

变形链球菌是目前公认的致龋菌。本实验中建立的人工龋菌斑生物膜型与口腔龈上菌斑有一定的相似性,并且较好地模拟了口腔环境中底物存在情况下牙菌斑的变化情况。变形链球菌是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌,它能产生有机酸,使牙体硬组织发生无机物的酸蚀脱矿,有机物崩解,最终导致龋病的发生^[4]。研究表明,革兰氏阳性菌较革兰氏阴性菌对 PDT 更为敏感,而多数致龋菌均为革兰氏阳性菌^[5],因而 PDT 可能通过有效抑制致龋菌的生长而起到防龋的作用。

生物膜是一种由基质包裹的、相互黏附并附着于体表或界面的细菌群体。在自然界,绝大多数细菌是附着在有生命或无生命物体的表面,以生物膜的方式生存生长。生物膜中的细菌由于粘附或集聚,其生物学特性明显不同于悬浮游离的细菌^[6]。

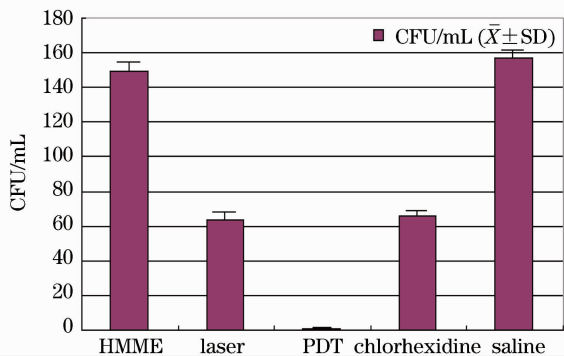


图 1 PDT 对人工龋菌斑生物膜变形链球菌活力的影响

Fig. 1 Influence of PDT to streptococcus mutans on dental plaque of oral biofilm of artificial dental caries

生物膜中的细菌代谢特点具有多样性。在生理状态下,生物膜中的细菌比游离状态下的同种细菌具有更强的产细胞内外多糖、抗饥饿和抗酸休克的能力^[7]。

牙菌斑就是一种典型的生物膜。牙菌斑生物膜中细菌不仅具有种群的多样性,而且相互黏附和集聚,在其周围有大量胞外多糖包绕形成微菌落,使生物膜的空间结构致密和复杂并具有不均匀性^[8],即生物膜是由许多微菌落组成的,各个微菌落中细菌的组成、生理状态、空间结构和环境因素均有明显差异。研究证实,把生物膜状态下的变链与游离状态的变链均置于蔗糖溶液中模拟酸休克状态,通过测试细菌活力证实生物膜状态下的变链具有更强的抗酸休克能力,能在较低的值下代谢生存^[9]。生物膜所处的外在环境也将反过来影响其中细菌的空间排列结构和它们的基因表达,环境中营养物的成分和量影响生物膜的成熟,最终导致细菌的组成和生物膜中化学成分改变^[10]。

本实验结果显示,单纯 HMME 处理不能杀灭人工龋口腔生物膜中变形链球菌;单纯激光照射虽然在一定程度上可使人工龋口腔生物膜中变形链球菌数量显著减少,但效果不如 PDT 防龋处理显著,二者具有显著性差异($P < 0.05$)。这是由于光动力作用是一种光激发的化学效应,光敏剂接受光照后,才能吸收光子的能量跃迁到激发态,受激发的光敏剂将能量传递给氧,产生一些活性氧成分(ROS),ROS 通过氧化作用来攻击细胞结构,导致细胞膜或蛋白质的氧化损伤,当氧化损伤的积累超过一定阈值时,细胞便开始死亡^[11]。HMME 在激光光照条件下对变形链球菌有很强的光动力杀伤作用,在本研究所采用的 HMME 浓度(质量分数)下,PDT 对变形链球菌有较强的杀菌效果,杀菌率高达 99.36%,显著高于单纯 HMME 处理组(0.05%)、单纯激光照射组(59.94%)以及洗必泰处理组(58.52%)。

PDT 过程可产生大量活性氧物质,这些活性氧物质恰恰可有效抑制变形链球菌生长。随着 PDT 治疗光剂量的增大,细胞的存活率也逐渐下降,这是传统 PDT 剂量学研究中的评估方法之一。研究表明,细胞存活率和 PDT 过程中所累积的单态氧辐射光子数呈正相关,即累积单态氧发光光子数能够很好地应用于 PDT 疗效评估。细胞的存活率随着累积单态氧发光光子数的增大而减小^[12]。本研究所应用的 HMME 属于国产第二代光敏剂,价格便

宜,更加符合理想光敏剂的特点,表现为光敏期短,作用的光波波长较长,因而增加了作用深度,产生的单态氧较多,而单态氧的浓度对光动力疗法的效果有着直接的影响^[13]。

口腔生物膜内的细菌对抗微生物制剂具有较强的抵抗力,因而造成龋齿和牙周炎的牙菌斑内的细菌对抗生素治疗敏感性较差。有研究表明,PDT 替代抗微生物制剂应用于牙周炎的治疗,可有效抑制龈下菌斑的形成。抗生素的应用是对抗口腔感染性疾病的传统方法,但多数细菌容易对抗生素产生耐药性^[14]。目前龋病免疫疫苗的研究虽已取得了较大进展,但仍有一些关键性问题尚无定论,无论是疫苗还是特异性抗体制剂,均需进行大量反复实验研究,才有可能用于临床试验。PDT 不产生耐药性,其有效应用为解决这一难题提供了新的途径。

5 结 论

结合前期研究^[15],本研究探讨了 HMME-PDT 对口腔生物膜致龋变形链球菌的作用,结果表明, HMME-PDT 可有效杀灭人工龋口腔生物膜中的变形链球菌,为预防龋病提供了一种有效的新途径, PDT 在治疗龋齿等口腔细菌性疾病方面具有广阔应用前景。

参 考 文 献

- 1 Fan Mingwen. Endodontics [M]. Third edition. Beijing: The People's Medical Publishing House, 2008. 14~31
樊明文 主编. 牙体牙髓病学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2008. 14~31
- 2 N. Solban, I. Rizvi I, T. Hasan. Targeted photodynamic therapy [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2006, **38**:522~531
- 3 P. Müller, B. Guggenheim, P. R. Schmidlin. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro [J]. *Eur. J. Oral. Sci.*, 2007, **115**:77~80
- 4 Yue Songling. Modern Dental Caries [M]. Beijing: Peking Union Medical College, Beijing Medical University Joint Publishing House, 1993. 63~88
岳松龄 主编. 现代龋病学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 63~88
- 5 M. N. Usacheva, M. C. Teichert, M. A. Biel. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms [J]. *Lasers Med. Surg.*, 2001, **29**:165~173
- 6 M. Wilson, H. Patel, J. Fletscher. Susceptibility of biofilms of streptococcus sanguis to chlorhexidine gluconate [J]. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1996, **11**(3):188~192
- 7 Mirva Drobni, Tong Li, Carina Krüger *et al.*. Host-derived pentapeptide affecting adhesion, proliferation, and local pH in biofilm communities composed of streptococcus and actinomyces species [J]. *Infection and Immunity*, 2006, **11**:6293~6299
- 8 J. Wimpenny, W. Manz, U. Szwedzyt. Heterogeneity in biofilms [J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, **24**(5):661~671

- 9 M. Zhu, S. Takenaka, M. Sato *et al.*. The genus abiotrophia is not monophyletic: proposal of granulicatella [J]. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2001, **16**(1):24~27
- 10 Xu Rongrong, Yue Songling, Hu Tao. Metabolic characteristics and influencing factors of bacterial biofilms[J]. *Foreign Stomatology Volumes*, 2004, **31**(1):42~43
徐蓉蓉,岳松龄,胡涛. 生物膜中细菌的代谢特点及影响因素[J]. *国外口腔医学分册*, 2004, **31**(1):42~43
- 11 D. Felix, J. P. Mello. Handbook of Plant & Fungal Toxicant [M]. New York: CPC Press, 1997. 192
- 12 Li Buhong, M. T. Jarvi, E. H. Moriyama *et al.*. Singlet oxygen dose assessment of photodynamic therapy C [J]. *Science in China Series G: Physics Mechanics Astronomy*, 2007, **37** (Suppl.):153~160
- 李步洪, M. T. Jarvi, E. H. Moriyama 等. 光动力学疗法的单态氧剂量评估 C [J]. *中国科学 G 辑: 物理学 力学天文学*, 2007, **37**(增刊):153~160
- 13 Cheng Gang, Zhong Qiuhai, Huang Naiyan *et al.*. Mathematics modeling and clinic experiment of photodynamic therapy for port wine stain [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(6):857~862
程刚,钟秋海,黄乃艳等. 鲜红斑痣光动力治疗数学模型及临床验证[J]. *中国激光*, 2006, **33**(6):857~862
- 14 P. F. Liu, W. H. Zhu, C. M. Huang. Vaccines and photodynamic therapies for oral microbial-related diseases[J]. *Curr. Drug. Metab.*, 2009, **10**(1):90~94
- 15 Zhaohui Zou, Ping Gao, Huijuan Yin *et al.*. Investigation of photodynamic therapy on streptococcus mutans of oral biofilm [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12):947~949