

牙菌斑生物膜研究模型的进展

黄银雪 霍丽珺 雷雅燕

【摘要】 口腔微生物群落是典型的生物膜,牙菌斑生物膜是多种菌属组成的三维结构,黏附在牙齿表面,具有生物膜结构和微生物生理学的功能。牙菌斑生物膜是龋病和牙周病的主要致病因素,已有多种生物膜模型用于研究龋病的病因、预防和治疗的研究。这些龋病生物膜模型有助于研究者用一种可控、简化的方式来预测龋病的临床进展结果。目前,研究龋病微生物的模型有体外单菌种生物膜模型和多菌种生物膜模型。本文将从研究龋病的生物膜体外模型建立做一综述。

【关键词】 牙菌斑; 模型,生物膜; 多菌种生物膜

Research progress on model of dental plaque biofilm Huang Yinxue, Huo Lijun, Lei Yayan.
Department of Endodontics, The Affiliated Stomatological Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650000, China

Corresponding author: Huo Lijun, Email: danling430@126.com

【Abstract】 Oral microbial community is a typical biofilm. The dental plaque biofilm possess a three-dimensional structure, which is composed of various bacteria and adheres to the surface of the teeth. It has the function of biofilm structure and microbial physiology. Dental plaque biofilm is one of key etiological factors of dental caries and periodontal diseases. A various models have been developed to study the mechanisms and courses of their formation as well as the etiology, prevention and treatment of dental caries. These carious biofilm models help researchers predict the clinical outcome of caries in a controlled and simplified manner. At present, the models for studying caries include single-species biofilm models and multispecies biofilm models *in vitro*. This review was presented the research progress on establish models of biofilm of dental caries.

【Key words】 Dental plaque; Modles, Biofilm; Multispecies biofilm

口腔微生物数量庞大、种类丰富,是目前口腔微生物学和生态学研究的热点。口腔微生物群落是典型的生物膜,龋病和牙周病是迄今研究最透彻的、由牙菌斑生物膜引发的疾病。牙菌斑生物膜是多种菌属组成三维结构,黏附在牙齿表面,具有生物膜结构和微生物生理学的功能^[1-2]。与浮游状态的同种细菌相比,生物膜中的细菌具有更强的耐药性、毒力及对抗宿主免疫防御的能力。目前,已建立多种生物膜模型用于龋病和牙周病的病因、预防和治疗的研究。本文将从龋病的微生物生物膜体外模型建立做一综述。

一、牙菌斑生物膜与口腔微生物组

口腔微生物组包含细菌、真菌、病毒、支原体及衣原体等多种生物体,浮游微生物悬浮于唾液内或形成菌斑生物膜附着在口腔内^[3]。口腔微生物组生态失衡不仅可诱发多种口腔疾病,如龋病、牙周病,还与早产、心血管疾病、糖尿病等全

身疾病紧密相关^[4]。牙菌斑生物膜是由多种微生物组成的复杂微生物群落,具有高度的结构性。在成熟菌斑中,特定种属的细菌往往彼此相邻,或混合在一起形成特殊的结构,对菌斑内细菌的毒力特性产生影响,从而改变生物膜的总体致病性^[1]。因此,研究牙菌斑微生物的定植、微生物与宿主共生以及微生物之间的相互作用有助于了解疾病病因和发展^[5]。

二、牙菌斑生物膜的立体结构及形成过程

牙菌斑生物膜是由口腔浮游状态的细菌黏附、聚集于获得性膜上形成的含有管道系统的蘑菇样或杆样小菌落,具有复杂的三维立体结构和一定的厚度^[6]。菌斑包括细胞及细胞外基质两部分。细胞外基质由蛋白质和细胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)构成,增强了生物膜的附着力和內聚力,保护附着细菌并促进局部pH降低形成酸性环境。细胞外多糖构成生物膜细菌生长的外环境对生物膜细菌有保护作用,其多孔网状结构有利于细菌捕获周围营养保证细菌饥饿状态下的新陈代谢,还能促进细菌间的黏附^[7]。菌斑内各菌种间构成有规律的共聚结合,丝状菌彼此平行并与牙面垂直生长,排列成栅栏状,球菌和杆菌围绕其周围形成玉米棒或麦穗样的结构,这样的结构有利于牙菌斑生物膜深层细菌获取营养物质和氧,同时增大了细菌的黏附面积。Zhou等^[8]

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2018.04.009

基金项目: 云南省科技厅—昆明医科大学联合专项基金项目 [2017FE467(-145)]

作者单位: 650000 昆明医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科

通信作者: 霍丽珺, 电子邮箱: danling430@126.com

通过激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)结合死菌与活菌荧光染色技术分析生物膜三维结构,发现牙菌斑生物膜中死菌和活菌分布不均衡,活菌荧光强度由内向外逐渐增加。菌斑生物膜的结构是底密顶疏,其中的管道系统则由顶向底口径逐渐减小或管道数减少。因此,内层细胞的营养和氧气相对缺乏,造成内层细胞的代谢产物较多,这可能是造成内层活菌比例较低的原因。而外层因为营养充分,细菌生长旺盛,所以活菌比例较高^[9]。

牙菌斑的形成过程是口腔浮游状态的细菌在牙面上的获得性膜上吸附、生长、移出和再附着的连续动力学过程。唾液蛋白或糖蛋白选择性吸附至牙面形成获得性膜。细菌黏附至获得性膜的时间由数分钟至数小时不等,不同菌种以不同速率吸附至获得性膜上。牙菌斑内每个菌种的代谢活动是相互关联的^[10],轻链球菌可储存多糖,可供菌斑内其他菌种消耗,使菌斑在缺乏碳水化合物的情况下继续产酸。牙菌斑微生物的种类和数量在菌斑形成和成熟过程中不断变化。Wake等^[11]通过使用16S rRNA基因对原位模型细菌进行定量和鉴定分析,结果显示在生物膜形成早期链球菌属和奈瑟菌属为主导细菌,在生物膜形成48 h后革兰氏阴性厌氧菌如梭杆菌属、普氏菌属和卟啉菌占优势。

三、牙菌斑生物膜体外模型建立

龋病微生物模型的建立常用于研究龋病的发展过程及影响因素,有助于研究者用一种可控、简化的方式来准确预测龋病的临床进展结果。目前,研究龋病微生物的模型有体外单菌种生物膜模型和多菌种生物膜模型。培养方式分为:封闭式分批培养和开放式连续培养模型。分批和连续培养方法可用于培养单一生物膜,多菌种生物膜(2~10种细菌)或微生物膜(使用唾液或菌斑样品作为接种物)^[12]。恒化器、恒定厚度生物膜发酵罐、人工口腔和Zurich模型等是常用的人工菌斑生物膜体外培养模型。

1. 单菌种生物膜:单菌种生物膜模型在龋病的研究中是常用于检测药物的抗菌性^[13-14]。Saputo等^[15]体外培养变异链球菌生物膜,发现变异链球菌对新型抗菌药物表现出明显易感性,为寻找新型有效的龋齿防治方法提供了可能性。Liu等^[16]在含有4种聚苯乙烯块的培养皿上建立变异链球菌生物膜模型,观察氯化钠、氨苄西林和氯己定对变异链球菌生物膜降解的影响。Ferrazzano等^[17]通过体外培养变异链球菌和罗氏菌单菌种生物膜,测定石榴汁和果皮提取物对变异链球菌和罗氏菌临床分离株的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度值,结果表明石榴多酚化合物可用于预防和治疗龋齿。Salli等^[18]使用人工口腔来测定含有蔗糖和木糖醇的薄荷糖产品对变异链球菌黏附和浮游细菌生长的影响,该人工口腔使用人造唾液作为生长介质,羟基磷灰石圆片模拟牙釉质,侧重于观察细菌黏附和生物膜形成早期情况。

单菌种生物膜模型优点在于一定程度的标准化、易重复,并且允许一次进行大量的测试分析^[19],但Filoche等^[20]研究认为,单菌种形成单一生物膜的能力不一定是其在复杂多菌种生物膜中存活和致病潜力的指标,同时细菌种类有限,

无法有效模拟牙菌斑生物膜的真实情况。

2. 体外多菌种模型:牙菌斑生物膜为多菌种生物膜,因此为了更好的模拟体内真实情况,在龋病研究中越来越多使用多菌种生物膜模型来研究牙菌斑生物膜的结构、粘接剂及新的防龋方法。该模型单菌种菌液浓度一般为调整为($10^7 \sim 10^8$ CFU/mL)再形成混合菌液,在玻片、牛牙釉质、羟基磷灰石圆片或立体牙牙本质片上形成生物膜,通过CLSM和扫描电镜(SEM)结合荧光染色技术分析生物膜三维结构。

(1)静态多菌种模型:Cavalcanti等^[21]将变异链球菌、内氏放线菌和戈登链球菌混合培养在含有唾液的牛牙釉质和牙本质块上形成多菌种生物膜,用于评价食物中碳水化合物致龋性和氟化物对牙釉质和牙本质脱矿的影响。研究表明,三菌种生物膜模型可用于评估除蔗糖外的碳水化合物的致龋能力,并可用于研究氟化物对牙菌斑的影响。Zhang等^[22]在体外培养变异链球菌、戈登链球菌和血链球菌,然后将细菌悬浮液混合以获得含变异链球菌(10^7 CFU/mL)、戈登链球菌(10^7 CFU/mL)和血链球菌(10^7 CFU/mL)的菌液,将200 μ L混合菌液和1.8 mL含1%蔗糖的BHI加入到24孔内,并在每个孔板内放入羟基磷灰石圆片形成多菌种生物膜。通过测定乳酸和pH值控制生物膜的产酸量,CLSM测量细菌体积比以确定生物膜的细胞外多糖产量,SEM成像活菌/死菌体积比率以控制多菌种生物膜的生物量,采用TaqMan实时聚合酶链式反应和荧光原位杂交成像技术研究生物膜比例变化。该研究认为,使用多菌种生物膜模型可模拟更多样化的微生物环境,理论上该生物膜模型能实现高度的重复性。Kim等^[23]通过在涂有唾液的羟基磷灰石圆片上培养内氏放线菌、链球菌和变异链球菌形成多菌种生物膜,观察蔓越莓类黄酮对变异链球菌产生EPS的影响。研究发现,蔓越莓类黄酮能破坏多菌种生物膜三维结构,造成EPS多孔网状结构塌陷以及使生物膜无法附着于圆片上。

较多研究表明,静态多菌种生物膜模型具有高度的可重复性^[24-26]。静态生物膜模型因其成本低及技术难度小,故在研究中常使用。但其主要局限性在于有限的营养供应,不适用于长期实验。

(2)动态多菌种模型:许多微生物需要在流动的条件下才能在微生物群落中繁殖形成生物膜,因此有学者采用动态模型为生物膜中微生物持续提供营养物质,其目标是通过不断提供营养和剪切流条件来模拟自然口腔环境^[27]。将恒化器与恒流装置相连接,将恒化器中生成的稳态混合菌液连续或间断地滴加在恒流装置中的实验表面上,从而形成菌斑生物膜,这类系统常用于菌斑生成和抗菌斑药物的作用效果研究^[28]。

Schlafer等^[29]设计口腔链球菌、血链球菌、轻型链球菌、道恩链球菌和内氏放线菌形成动态多菌种生物膜模型模拟龋病早期产酸的细菌群落,采用荧光原位杂交和CLSM对生物膜的结构和组成进行分析。研究表明,该动态生物膜与活体口腔内牙菌斑生物膜结构高度相似。

Blanc等^[30]使用口腔链球菌、内氏放线菌、小韦荣菌、具

核梭杆菌、伴放线聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌建立多菌种生物膜模型,用于评估恒定剪切流下生物膜的发育。细菌首先在 Lambda Minifor 生物反应器中生长,然后在羟基磷灰石圆盘上使用改进的 Robbins 装置建立生物膜,使用 SEM、活菌/死菌染色和荧光原位杂交技术分析培养了 3~7 d 的生物膜。采用 SEM 和 CLSM 观察形成过程中生物膜的组成。研究表明,该模型是一个高度可重复的多菌种口腔生物膜动态形成系统,可用于临床前药物抗菌性的评估。同时在龈上和龈下牙菌斑生物膜的基础研究中有很好的应用前景。

四、小结

牙菌斑生物膜的生化特性影响了龋病治疗的效果^[31]。牙菌斑生物膜菌种繁多,具有复杂的三维立体结构,且在菌斑形成和成熟过程中微生物不断发生变化。在体外实验中完全复制其特征是很困难,但并非不可能。单一的生物膜研究可能会过度简化生物膜内的生态现象。因此,在选用模型时候,应该根据所研究的问题来选择合适的生物膜模型,以获得正确的结果^[12,32]。

参 考 文 献

- [1] 周学东,施文元. 人体口腔微生物组群与牙菌斑生物膜[J]. 华西口腔医学杂志, 2010,28(2):115-118.
- [2] Santin GC, Oliveira DS, Galo R, et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature [J]. Scientific World Journal, 2014(2014):824538.
- [3] Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem [J]. Dent Clin North Am, 2017,61(2):199-215.
- [4] Sampaio - Maia B, Caldas IM, Pereira ML, et al. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases [J]. Adv Appl Microbiol, 2016(97):171-210.
- [5] 周学东,徐健,施文元. 人类口腔微生物组学研究:现状、挑战及机遇[J]. 微生物学报, 2017,57(6):806-821.
- [6] 凌均荣. 牙菌斑生物膜的研究进展[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2008,2(2):103-108.
- [7] 黎卫兰,徐琼. 粪肠球菌生物膜细胞外聚合物的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2011,38(4):426-429.
- [8] Zhou H, Liu H, Weir MD, et al. Three - dimensional biofilm properties on dental bonding agent with varying quaternary ammonium charge densities[J]. J Dent, 2016(53):73-81.
- [9] 董维理,周影虹,李成章,等. 自然牙菌斑生物膜模型的构建及应用[J]. 上海口腔医学, 2010,19(2):196-201.
- [10] Bourgeois D, David A, Inquimbert C, et al. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults [J]. PLoS One, 2017,12(10):e0185804.
- [11] Wake N, Asahi Y, Noiri Y, et al. Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an in situ model of dental biofilms [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2016(2):16018.
- [12] Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review [J]. J Oral Microbiol, 2015(7):26149.
- [13] Liu Y, Ren Z, Hwang G, et al. Therapeutic Strategies Targeting Cariogenic Biofilm Microenvironment [J]. Adv Dent Res, 2018, 29(1):86-92.
- [14] Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols [J]. Adv Dent Res, 2018,29(1):110-116.
- [15] Saputo S, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. A drug repositioning approach reveals Streptococcus mutans is susceptible to a diverse range of established antimicrobials and nonantibiotics [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017,62(1).pii:e01674-17.
- [16] Liu J, Ling JQ, Zhang K, et al. Effect of sodium fluoride, ampicillin, and chlorhexidine on Streptococcus mutans biofilm detachment [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(8):4532-4535.
- [17] Ferrazzano GF, Scioscia E, Sateriale D, et al. In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria [J]. Biomed Res Int, 2017(2017):2152749.
- [18] Salli KM, Guroy UK, Söderling EM, et al. Effects of Xylitol and Sucrose Mint Products on Streptococcus mutans Colonization in a Dental Simulator Model [J]. Curr Microbiol, 2017,74(10):1153-1159.
- [19] Mira A. Oral Microbiome Studies: Potential Diagnostic and Therapeutic Implications [J]. Adv Dent Res, 2018,29(1):71-77.
- [20] Filoche SK, Anderson SA, Sissons CH. Biofilm growth of Lactobacillus species is promoted by Actinomyces species and Streptococcus mutans [J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(5):322-326.
- [21] Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, et al. A three - species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization[J]. Biofouling, 2014,30(5):579-588.
- [22] Zhang K, Wang S, Zhou X, et al. Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation [J]. J Dent Res, 2015,94(4):622-629.
- [23] Kim D, Hwang G, Liu Y, et al. Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed - Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption [J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0145844.
- [24] Han Q, Li B, Zhou X, et al. Anti - Caries Effects of Dental Adhesives Containing Quaternary Ammonium Methacrylates with Different Chain Lengths [J]. Materials (Basel), 2017, 10(6). pii:E643.
- [25] Ge Y, Ren B, Zhou X, et al. Novel Dental Adhesive with Biofilm-Regulating and Remineralization Capabilities [J]. Materials (Basel), 2017,10(1).pii:E26.
- [26] Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, et al. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development [J]. Caries Res, 2013,47(4):318-324.
- [27] Gabriliska RA, Rumbaugh KP. Biofilm models of polymicrobial infection [J]. Future Microbiol, 2015,10(12):1997-2015.
- [28] 鲁纯,陈武,刘来奎. 牙菌斑生物膜模型的研究进展[J]. 国际

- 口腔医学杂志, 2009, 36(4):469-471.
- [29] Schlafer S, Raarup MK, Meyer RL, et al. pH landscapes in a novel five-species model of early dental biofilm [J]. PLoS one, 2011, 6(9):e25299.
- [30] Blanc V, Isabal S, Sánchez MC, et al. Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation [J]. J Periodontol Res, 2014, 49(3):323-332.
- [31] Marsh PD. In Sickness and in Health - What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective [J]. Adv Dent Res, 2018, 29(1):60-65.
- [32] Darrene LN, Cecile B. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature [J]. Biomed Res Int, 2016(2016):7461047.
- (收稿日期:2018-04-01)
(本文编辑:王嫚)

黄银雪, 霍丽珺, 雷雅燕. 牙菌斑生物膜研究模型的进展[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2018, 12(4):251-254.

· 专家视频讲座 ·

种植牙龈乳头的保留与重建

王劲茗

种植修复的红色美学 PES 评价标准(Fürhauser, 2005)的7个要素中, 龈边缘及龈乳头最为重要。种植体周围龈乳头的特点是: 无垂直向结缔组织纤维附着, 纤维附着不紧密, 缺乏牙周膜结构, 且颈部为致密纤维结缔组织带, 缺乏血供。因此种植体周软组织在炎症或受到刺激时, 比天然牙更容易发生软组织萎缩。

影响种植体龈乳头高度的因素有很多, 其中最重要的是血液供应的质和量, 它决定了牙槽骨和牙龈乳头的稳定性。为获得良好的血供质量, 在种植时应选用平台转换的植体、小直径种植体、并注意控制好植体间距离。

对待美学区尚未拔牙的患者, 应尽量选用微创

拔牙即刻种植, 因为拔牙窝骨壁的完整性对拔牙窝再生潜能至关重要。拔牙后就诊的患者在行骨增量手术时, 手术切口设计尽量微创, 保留牙龈乳头的切口方式可较好地维持牙龈乳头高度, 最大限度保留植体周软硬组织。

二期进行临时修复时, 应及时调整牙龈外形, 约4周1次, 注意策略对薄龈及厚龈生物型有所区别。

对于种植体周牙龈乳头等软组织重建, 目前还处于实验室研究阶段。比如牙骨质再生支持的生物个性化基台有望形成类似牙周膜结构, 3D打印支架复合生长因子再生牙间骨嵴, 或是利用生长因子再生纤维化牙龈乳头, 消除黑三角。甚至将非角化龈转化为角化龈。这些研究成果有望改善多牙种植中牙龈乳头低平的难题。

较重建而言, 保留相对容易, 因此最大限度保留软硬组织是实现前牙美学的捷径。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2018.04.012

作者单位: 510055 广州, 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室

王劲茗. 种植牙龈乳头的保留与重建[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2018, 12(4).