

鸡卵黄特异抗体对人牙菌斑中变形链球菌影响的体内研究

周 智 周汝俊 唐 镇 胡德渝

【摘要】目的 探讨鸡卵黄特异抗体(IgY)对健康人牙菌斑中变形链球菌构成比的影响。**方法** 选择志愿受试者 24 人,随机分为 3 组:实验组(9 人)使用 1.5 % IgY;阳性对照组(9 人)使用 1.7 mmol/L 洗必太溶液;阴性对照组(6 人)使用 PBS 缓冲生理盐水,各组均于饭后用药含漱 1 min,持续 3 周。分别于用药前、用药中 1、2、3 周及停药后 1、3、5 周记录菌斑指数,并收集光滑面集合菌斑样本在 MS 及 MSB 培养基中微需氧环境培养,检测菌斑中口腔链球菌群及变形链球菌的菌落形成数,分析各组使用药物前后菌斑中变形链球菌所占比例的变化及变化的延续性。**结果** 应用 IgY 后,其菌斑指数无明显改变,但牙菌斑中变形链球菌群在口腔链球菌群中的比例明显降低,并且在较长时间内(停药后 5 周)保持菌斑中变形链球菌的低水平。**结论** IgY 处理后牙面菌斑的菌群微生态发生改变,为进一步研究牙菌斑微生态防治打下基础。

【关键词】 鸡卵黄抗体; 菌斑; 变形链球菌; 口腔链球菌群

Effects of Topical Application of Immunoglobulin Yolk on Mutans Streptococci in Dental Plaque

ZHOU Zhi^{*}, ZHOU Rujun, TANG Zhen, et al. (^{*} Department of Preventive Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】Objective To evaluate the inhibitory effects of topical application of specific immunoglobulin yolk antibodies (IgY) to *mutans streptococci* on composition of human dental plaque. **Methods** A total of 24 healthy adult volunteers were selected and randomly distributed into three experimental groups. After a supragingival scaling, the subjects were treated with an application of IgY containing spray (test group, $n = 9$), a 0.15 % chlorhexidine (CH) spray (positive control group, $n = 9$) or a placebo phosphate buffered saline (PBS) spray without any active ingredients (negative control group, $n = 6$) three times daily for three weeks. Pooled plaque samples from the smooth surfaces of teeth were collected for microbiologic analysis before administration (baseline, day 0), during treatment (days 7, 14 and 21) and after withdrawal of the agents (days 28, 42 and 56) and plaque index were recorded. Microbial cultivation were performed by serially diluting the samples with PBS solution and cultivating the aliquots on mitis salivarius agar (MS) and MS supplemented with bacitracin (MSB) for *oral streptococci* and *mutans streptococci* respectively. The number of colony-forming unit (CFU) per plate was counted and the percentage of *mutans streptococci* per *oral streptococci* in dental plaque were determined. The effect of IgY on colonization of *mutans streptococci* were analyzed by an analysis of variance (ANOVA). **Results** The plaque indexes remained unchanged, but *mutans streptococci* in dental plaque was suppressed significantly following a short term (three weeks) application of IgY, and low level of *mutans streptococci* persisted for at least 5 weeks after withdrawal of IgY. **Conclusion** The results suggest that the immunization with specific immunoglobulin yolk against *mutans streptococci* could be useful for long term suppression of *mutans streptococci* colonization in human dental plaque.

【Key words】 immunoglobulin yolk antibodies (IgY); dental plaque; *mutans streptococci*; *oral streptococci*

控制牙菌斑和牙菌斑中的致龋菌是预防龋病的重要环节。研究^{1,2}证实局部使用抗变形链球菌或其亚单位的鸡卵黄特异性抗体(immunoglobulin yolk, IgY)可以显著降低实验动物菌斑的形成和龋齿发生。但有关 IgY 在人口腔中对致龋菌的作用及持续时间研究还较少。本研究应用 IgY 对受试者做被动免

疫后,检测受试者牙菌斑中变形链球菌群(*mutans streptococci*,简称变链菌)在口腔链球菌群(*oral streptococci*)细菌中所占比例的改变,了解 IgY 对口腔致龋菌的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.5 % 抗变形链球菌鸡卵黄抗体(IgY),喷雾剂型,本课题组提取配制。醋酸洗必太(chlorhexidine, CH),浓度为 1.7

作者单位:610041 四川大学华西口腔医院预防科(周智,胡德渝),江西医学院附属口腔医院口腔内科(周汝俊,唐镇)

mmol/L, 喷雾剂型, 外观及口感与 IgY 口含液相一致, 自配。磷酸盐缓冲液生理盐水 (PBS) 0.01 mol/L, pH 为 7.0, 喷雾剂型, 自配。杆菌肽 (Calbiochem - Novabiochem Corporation Potency, 美国)。轻唾琼脂培养基 (MS 培养基) 及轻唾—杆菌肽琼脂选择性培养基 (MSB 培养基), pH 值为 7.6, 自制³。MCO-1752 多功能三气培养箱 (SANYO, 日本)。

1.2 研究对象及分组

选择 24 名健康志愿者为研究对象。男 18 人, 女 6 人, 年龄 20~23 岁。24 人随机分为 3 组: IgY 组 (实验组) 9 人, 用 IgY 口含液; CH 组 (阳性对照组) 9 人, 用洗必太口含液; PBS 组 (阴性对照组) 6 人, 用 PBS 缓冲液生理盐水。试验采用单盲法, 试验组与对照组所使用的口含液外观、口感均一致。

研究对象纳入要求: 身体健康、无系统性疾病; 受试前 1 月未使用过抗生素、激素、免疫制剂以及含有抗生素的漱口剂、牙膏等; 口腔内无未经治疗的龋齿; 口内龋失补牙数小于 4; 指数牙无缺失; 且口腔内无妨碍口腔卫生的修复体、矫治器等。

1.3 样本收集

1.3.1 初次样本 (用药前) 的收集 实验对象全口洁牙, 每日用白玉无氟牙膏刷牙, 停止其它口腔卫生措施 2 d 后, 于 15:00~16:00 采集集合菌斑样本。记录 6 个指数牙 (4 个第一恒磨牙、右上颌及左下颌中切牙) 的菌斑指数。菌斑指数计分用改良 Quigley-Hein 菌斑指数计分法⁴; 然后以无菌刮匙收集 4 个第一恒磨牙颊面及舌面菌斑, 立即置入 PBS 缓冲生理盐水, 送实验室培养。

1.3.2 给药及样本收集 采集初次样本后, 按组给不同的喷雾剂, 每日 3 次于饭后喷至牙面。上下左右颊舌面各喷 3 下, 含漱 1 min。用药后 30 min 内不得进食、饮水和漱口。连续使用 3 周后各组同时停药。记录用药 1、2、3 周时的菌斑指数并检测菌斑中细菌; 停药 1、3、5 周时继续检测 IgY 组及 CH 组; PBS 组于停药 1 周后即停止检测。

1.4 细菌接种培养

样本振荡混匀, 按 10 倍稀释法连续稀释到 10^{-5} 浓度, 取稀释样本 0.1 ml 接种于 MS 培养基 (做口腔链球菌属细菌培养计数) 及 MSB 选择性培养基 (做变链菌群细菌培养计数); 微需氧 (90% N_2 、10% CO_2) 37℃, 培养 48 h。计数培养皿中生长的菌落形成单位数 (colony forming unit, CFU), 取均值; 计算菌斑中变链菌群细菌占口腔链球菌群细菌的百分比 (变链比), 用变链比来反映菌斑中变链菌的改变。

1.5 统计分析

应用 SPSS 10.0 统计软件分析 IgY 使用前、中、后菌斑指数及菌斑中变链比变化差异的总体比较用方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。

2 结 果

2.1 3 个组的菌斑指数

3 个组用药前、中、后的菌斑指数测量值, 见表 1。从表 1 可见, 3 组间在用药前菌斑指数无明显差异

($P > 0.05$); 用药后, IgY 组菌斑指数与 PBS 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。但 CH 组菌斑指数与 IgY 组及 PBS 组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。用药前后自身比较, IgY 组 ($P > 0.05$) 和 PBS 组 ($P > 0.05$) 的菌斑指数无显著性变化, 但 CH 组在用药前后有显著性差异 ($P < 0.001$)。

表 1 实验期间 3 组受试者的菌斑指数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Plaque Index of the three groups over the study period ($\bar{x} \pm s$)

测量时间	菌斑指数		
	IgY 组	CH 组	PBS 组
用药前	2.241 1 \pm 0.601 4	2.703 3 \pm 0.455 5	2.333 3 \pm 0.394 7
用药 1 周	2.128 9 \pm 0.423 4	1.722 2 \pm 0.220 5	2.357 1 \pm 0.280 7
用药 2 周	1.981 1 \pm 0.293 5	1.517 8 \pm 0.543 5	2.056 7 \pm 0.292 0
用药 3 周	1.834 4 \pm 0.264 1	1.351 1 \pm 0.305 4	1.831 7 \pm 0.515 1
停药 1 周	1.890 0 \pm 0.250 8	1.390 0 \pm 0.472 4	2.000 0 \pm 0.348 0
停药 3 周	1.982 2 \pm 0.210 0	1.462 2 \pm 0.491 5	
停药 5 周	2.018 9 \pm 0.376 0	1.462 2 \pm 0.446 2	

2.2 菌斑细菌的检测

3 组实验过程中变链比的变化, 见表 2, 图 1。从表 2 可见, 用药前 3 组间菌斑中变链比无显著性差异 ($P > 0.05$)。从用药第 1 周开始, IgY 组变链比下降, 与 PBS 组相比差异不明显 ($P > 0.05$); 用药第 2、3 周 IgY 组和 CH 组变链比明显下降, 与 PBS 组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 IgY 组与 CH 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

停药后, IgY 组变链比开始上升。自身比较见 IgY 组菌斑中变链比在停药 5 周后, 较基线仍有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明 IgY 对变链菌在牙面黏附的抑制作用显著, 并且在停止用药后 5 周仍能保持此作用。

表 2 实验期间 3 组菌斑中变链比变化 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab 2 The percentage of mutans streptococci per oral streptococci in dental plaque of the three groups over the study period ($\bar{x} \pm s$, %)

检测时间	变链比		
	IgY 组	CH 组	PBS 组
用药前	19.674 \pm 6.862	19.826 \pm 5.193	18.264 \pm 7.641
用药 1 周	13.407 \pm 3.902	10.002 \pm 4.394	17.202 \pm 7.432
用药 2 周	10.172 \pm 4.553	7.588 \pm 3.960	17.642 \pm 7.012
用药 3 周	5.320 \pm 3.711	3.891 \pm 3.167	16.227 \pm 6.433
停药 1 周	6.340 \pm 2.914	6.115 \pm 4.904	17.143 \pm 4.965
停药 3 周	6.565 \pm 2.257	10.800 \pm 8.659	
停药 5 周	8.188 \pm 2.241	11.602 \pm 6.996	

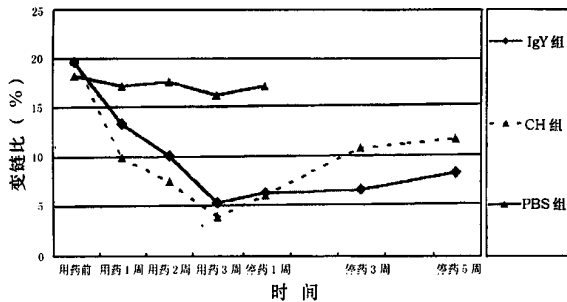


图1 实验期间3组菌斑中变链比的变化

Fig 1 Changes in the percentage of mutans streptococci per oral streptococci in plaque

3 讨 论

变链菌致龋必须首先黏附于牙面形成牙菌斑这一特定的生态环境。研究证明应用针对变链菌全菌或亚单位的单克隆或多克隆抗体被动免疫动物和人均能有效抑制变链菌在牙面上的黏附定植,并能在较长时间内维持变链菌的低水平^{5,6}。

本研究未观察到 IgY 组菌斑指数有明显下降,只有 CH 组菌斑指数下降,这与 Hamada 等¹的结果不一致,其原因可能是 Hamada 实验中使用的是定菌鼠,菌斑细菌种类单一,而本研究是在正常人口腔环境中完成。有研究表明菌斑细菌中变链菌只占极少部分,大约占光滑面细菌总数的 2%~7%,甚至少于 1%^{7,8}。因此笔者认为由于 IgY 的特异性,它主要用于变链菌,而对其它细菌无抑制作用。变形链球菌的减少不足以改变菌斑细菌的总数,故菌斑指数下降不明显。至于 CH 组菌斑指数的下降则与其抑菌谱广有关。

研究证实^{9,10},抗变链菌 IgY 可以抑制变链菌及结合性葡糖基转移酶合成非水溶性葡聚糖的能力,并且能有效干扰变链菌对唾液包被的羟基磷灰石的粘附;对已粘附到羟基磷灰石的变链菌也具有一定的解脱黏附的作用。这可能是用药期间菌斑中变链比下降的一个重要原因。

Ma 等⁵和 Loimaranta 等⁶研究表明,虽然应用抗体后细菌的总菌落数没有显著性改变,但变链菌和血链菌的黏附受到抑制,故其检出水平大幅下降。Ma 等还认为:抗体通过抑制干扰变链菌和血链菌在牙面的黏附定植而改变了口腔内的生态环境,即不易致龋

的健康菌斑替代了原有的致龋性菌斑。由于微生态平衡的改变,使得抗体在口腔局部虽是短期应用,但却可在较长的时间内抑制变链菌在牙面聚集而起到预防龋齿的作用。

本研究结果显示,使用 IgY 后受试者口腔中菌斑指数没有明显下降,但菌斑中变链比却在较长时间内维持低水平。这说明, IgY 处理后牙面菌斑的菌群发生生态变化,由原来的变链比较高的菌斑转变成低水平变链比的不易致龋的菌斑。因此认为应用 IgY 被动免疫防龋符合牙菌斑微生态防治的原则。

参考文献

- 1 Hamada S, Horikoshi T, Minami T, et al. Passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 1991, 59(11): 4161-4167
- 2 Smith DJ, King WF, Gdisk R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect Immun, 2001, 69(5): 3135-3142
- 3 肖晓蓉主编. 口腔微生物学及实用技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992: 180-181
- 4 卞金有主编. 口腔预防医学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 34
- 5 Ma J K, Hunjan M, Smith R, et al. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 1990, 58(10): 3407-3414
- 6 Loimaranta V, Laine M, Soderling E, et al. Effects of bovine immune and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. Eur J Oral Sci, 1999, 107(4): 244-250
- 7 刘天佳主编. 口腔疾病的微生物学基础. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 17-19
- 8 Thylstrup A, Fejerskov O. Textbook of Cariology. Copenhagen: Munksgardid, 1986: 64-68
- 9 文冰, 周汝俊, 杨健, 等. 抗变形链球菌鸡卵黄抗体对变形链球菌合成葡聚糖影响的实验研究. 上海口腔医学, 2002, 11(2): 141-143
- 10 周智, 赵豫, 唐镇, 等. 抗、型变形链球菌鸡卵黄抗体 (IgY) 对已粘附变形链球菌的影响研究. 中国临床医药研究杂志, 2000, 31: 4901-4902

(2002-01-24 收稿, 2003-02-14 修回)

(本文编辑 邓本姿)