

[文章编号] 1000-1182(2011)03-0302-04

口腔链球菌对白假丝酵母菌的拮抗作用

张琳¹ 孙珺¹ 李多¹ 肖晓蓉¹ 朱殊¹ 龚其美¹ 周红梅²

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 黏膜科, 成都 610041)

[摘要] 目的 观测3种口腔链球菌对白假丝酵母菌的生长有无抑制作用。方法 采用直接点种法、反点种菌落计数法和液体共培养法观测口腔变异链球菌、血链球菌、唾液链球菌对白假丝酵母菌的拮抗作用。结果 1)直接点种法中各组均未观察到清晰的抑菌圈; 2)唾液链球菌软琼脂上的白假丝酵母菌菌落数较对照组减少($P<0.05$); 3)活菌与白假丝酵母菌液体共培养中, 在各个时间点上变异链球菌组与对照组之间菌落计数差异均有统计学意义($P=0.001$); 4)细菌培养基上清液与白假丝酵母菌液体共培养中, 在24、48、72 h时间点上, 各实验组与对照组之间菌落计数差异均有统计学意义($P=0.001$); 多数时间点上, 各实验组间菌落计数差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 3种口腔链球菌对白假丝酵母菌的体外生长有明显抑制作用, 但尚不能确定哪种链球菌的抑制作用更强, 并且抑制作用会逐渐衰减。

[关键词] 白假丝酵母菌; 变异链球菌; 唾液链球菌; 血链球菌; 拮抗作用

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.03.021

The antagonistic effect of the oral Streptococcus on the *Saccharomyces albicans* in vitro ZHANG Lin¹, SUN Jun¹, LI Duo¹, XIAO Xiao-rong¹, ZHU Zhu¹, GONG Qi-mei¹, ZHOU Hong-mei². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antagonistic effects of three species of oral Streptococcus on the growth of oral *Saccharomyces albicans* in vitro. **Methods** Direct inoculation method, reverse inoculation method and mixed culture methods were respectively chosen to observe the changes of *Saccharomyces albicans* colony formation on the effects of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius*. **Results** 1)No clear inhibition zone was observed in each of the groups by direct inoculation method. 2)Compared with the control groups, *Saccharomyces albicans* colony formation on soft agar of *Streptococcus sanguis* decreased significantly($P<0.05$). 3)Mixed culture method results showed that *Streptococcus mutans* could inhibit the growth of *Saccharomyces albicans* significantly at different time points($P=0.001$). 4)Under the action of bacteria culture supernatant, the count of *Saccharomyces albicans* in experiment groups showed statistical significance when compared with the control groups at 24, 48, 72 h($P=0.001$); The differences among the experimental groups were of no statistical significance at majority times($P>0.05$). **Conclusion** *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, and *Streptococcus salivarius* could obviously inhibit the growth of *Saccharomyces albicans* in vitro. However, it is still unclear that among which the inhibition effects is stronger. The antagonistic effects is weakened gradually.

[Key words] *Saccharomyces albicans*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus salivarius*; antagonistic effect

近年来, 有关各型口腔链球菌对白假丝酵母菌拮抗作用的研究较多, 但主要集中在营养竞争、黏附竞争等方面。学者^[1]从血链球菌分离出小分子抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)拮抗变异链球菌,

本课题组前期研究发现口腔放线菌可能分泌某种拮抗物质对白假丝酵母菌产生抑制作用^[2]。上述实验结果均提示: 口腔链球菌是否也可能通过产生一些抗菌物质来拮抗白假丝酵母菌呢? 本研究拟观测3种口腔链球菌对白假丝酵母菌的拮抗作用, 为研究口腔黏膜微生态中的菌群间相互作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株及试剂

口腔白假丝酵母菌标准株ATCC10691、口腔变异

[收稿日期] 2010-10-13; [修回日期] 2010-12-10

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20070610-067)

[作者简介] 张琳(1986—), 女, 河北人, 硕士

[通讯作者] 周红梅, Tel: 028-85503480

链球菌标准株ACTT25175、口腔血链球菌标准株AC-TT10556、口腔唾液链球菌标准株ACTT93419由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。1.6%TPY琼脂、TPY液体培养基、CHROMagar假丝酵母菌选择培养基(郑州博赛生物制品公司)。

1.2 实验方法

采用直接点种法、反点种菌落计数法、活菌与白假丝酵母菌液体共培养法、细菌培养基上清液与白假丝酵母菌液体共培养、灭活细菌与白假丝酵母菌液体共培养法观测3种口腔链球菌对白假丝酵母菌的拮抗作用。

1.2.1 直接点种法^[3-4] 配制含有白假丝酵母菌悬液(1×10^8 、 1×10^7 CFU·mL⁻¹)的TPY琼脂(1:10)和3种链球菌悬液(1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 CFU·mL⁻¹)。于白假丝酵母菌TPY琼脂上分别点种不同浓度的3种链球菌各5 μ L,同时点种相同剂量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)作为对照组。于兼性厌氧环境下培养24 h,观察是否出现抑菌圈。

1.2.2 反点种菌落计数法^[2] 配制含有唾液链球菌、血链球菌和变异链球菌悬液(1×10^8 CFU·mL⁻¹)的TPY琼脂(1:10),以不含菌悬液的TPY琼脂作为对照组。配制白假丝酵母菌悬液,用PBS连续稀释至 1×10^3 CFU·mL⁻¹。各平板分别点种6个点,每点点种5 μ L白假丝酵母菌悬液。于兼性厌氧环境下培养24 h,观察每点5 μ L白假丝酵母菌菌落数的变化。

1.2.3 活菌与白假丝酵母菌液体共培养法 配制白假丝酵母菌、唾液链球菌、血链球菌和变异链球菌悬液(1×10^8 CFU·mL⁻¹)。将白假丝酵母菌分别和3种链球菌悬液各100 μ L共培养于2 mL TPY液体培养基中,共培养5组用于连续观察。将白假丝酵母菌悬液100 μ L培养于1 mL TPY液体培养基中,共培养5组作为对照组。于兼性厌氧环境下培养120 h,每24 h取出一组连续稀释至 1×10^3 CFU·mL⁻¹后,各取20 μ L点种于CHROMagar选择培养基上,24 h后菌落计数。每组重复3次。

1.2.4 细菌培养基上清液与白假丝酵母菌液体共培养 配制3种链球菌悬液(1×10^8 CFU·mL⁻¹)。分别取1 mL上述液体与9 mL TPY液体培养基混匀,培养24 h后,各取2 mL液体培养基,于2 000 r·min⁻¹离心5 min后,分离提取上清液1 mL与1 mL白假丝酵母菌悬液(2.4×10^8 CFU·mL⁻¹)共培养于8 mL TPY液体培养基中。对照组用PBS溶液1 mL与白假丝酵母菌悬液1 mL置于8 mL TPY液体培养基中。连续培养120 h,每24 h取出1 mL菌悬液倍比稀释至 1×10^3 CFU·mL⁻¹,各取20 μ L点种于CHROMagar选择培养基上,培养

24 h后进行菌落计数,并换算成对数值。每组重复3次。

1.2.5 灭活细菌与白假丝酵母菌液体共培养法^[2] 在琼脂糖平板上分别接种3种链球菌,37 $^{\circ}$ C培养24 h后,将平板置于紫外灯下0.5 m处照射2 h。为了验证紫外线是否将细菌灭活,照射后取菌转种至另一琼脂糖平板,37 $^{\circ}$ C培养24 h后观察是否能长出菌落。结果3个转种平板上均未出现链球菌菌落^[3]。实验组设置为3组,每组取足够的灭活菌配制菌悬液(调整密度为 1×10^8 CFU·mL⁻¹),取1 mL菌悬液与1 mL白假丝酵母菌悬液置于8 mL液体培养基共培养120 h,对照组用1 mL PBS溶液与1 mL白假丝酵母菌悬液置于8 mL TPY液体培养基中。连续培养120 h,每24 h取出1 mL菌悬液倍比稀释至 1×10^3 CFU·mL⁻¹后,取20 μ L点种于CHROMagar选择培养基上,培养24 h后进行菌落计数,并换算成对数值。每组重复3次。

1.3 统计分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,反点种菌落计数法组间均数比较用单因素方差分析,余实验结果均采用重复测量方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 直接点种法

各组均未观察到清晰的抑菌圈,除对照组外,各组与白假丝酵母菌草坪菌交界处可见1 mm左右透亮区域。

2.2 反点种菌落计数法

唾液链球菌软琼脂上的白假丝酵母菌菌落数较对照组减少($P<0.05$),变异链球菌、血链球菌软琼脂上的白假丝酵母菌菌落数大于100而无法确切计数(表1)。唾液链球菌的抑菌作用与直接点种法结果一致。

表1 3种链球菌软琼脂点种白假丝酵母菌24 h后菌落计数

Tab 1 Counted of *Saccharomyces albicans* on three kinds of TPY soft agar after 24 h

CFU·mL ⁻¹					
组别	重复次数	均数	标准差	最大值	最小值
变异链球菌	6	>100	>50	>100	>100
血链球菌	6	>100	>50	>100	>100
唾液链球菌	6	39	5.67	46	32
对照组	6	69	5.68	75	59

2.3 活菌与白假丝酵母菌液体共培养法

根据各个时间点菌落数的对数值表(取平均值)绘制的白假丝酵母菌生长变化曲线见图1。统计分析表明:在各个时间点上变异链球菌组与对照组之间菌

落计数差异均有统计学意义($P=0.001$), 唾液链球菌组以及血链球菌组在72、96、120 h时间点上, 与对照组相比其差异具有统计学意义($P=0.001$)。3个实验组白假丝酵母菌菌落数目在24、48、72 h均低于正常对照组, 说明3种细菌可抑制白假丝酵母菌的生长。

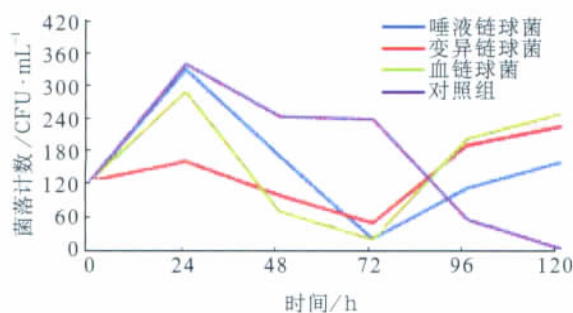


图1 链球菌活菌与白假丝酵母菌液体共培养中白假丝酵母菌的生长变化曲线

Fig 1 Growth curve of *Saccharomyces albicans* in mixed culture with bacteria

2.4 细菌培养基上清液与白假丝酵母菌液体共培养

根据各个时间点菌落数的对数值表(取平均值)绘制的白假丝酵母菌生长变化曲线见图2。统计分析表明: 在24、48、72 h时间点上, 各实验组与对照组之间菌落计数差异均有统计学意义($P=0.001$); 多数时间点上, 各实验组间菌落计数差异无统计学意义($P>0.05$)。总体来讲, 3种链球菌上清液对白假丝酵母菌的生长具有抑制作用, 但随着时间的推移, 这种抑制作用呈现衰减趋势。与活菌与白假丝酵母菌液体共培养法的结果做横向比较, 二者结果基本一致, 说明3种链球菌可分泌某种物质从而产生对白假丝酵母菌的拮抗作用。

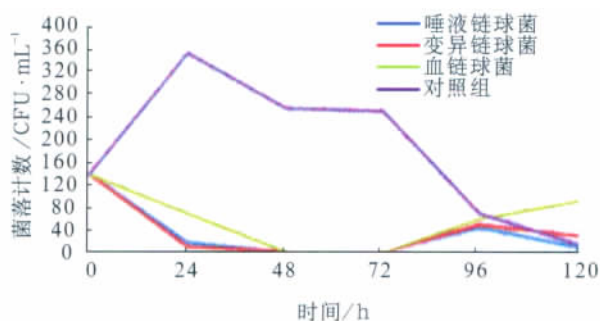


图2 细菌培养基上清液与白假丝酵母菌液体共培养中白假丝酵母菌的生长变化曲线

Fig 2 Growth curve of *Saccharomyces albicans* in mixed culture with supernate of bacteria culture media

2.5 灭活细菌与白假丝酵母菌液体共培养法

根据各个时间点菌落数的对数值表(取平均值)绘制的白假丝酵母菌生长变化曲线见图3。从图3可见, 各组细菌总量呈下降趋势, 但对照组与实验组之间数据波动大, 曲线呈交织状, 尚不能肯定3种口腔链球菌在此种处理下对白假丝酵母菌仍有抑制作用。

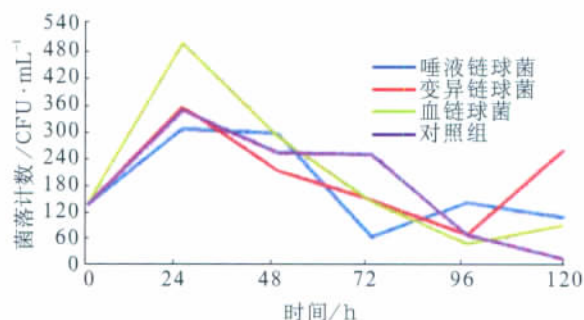


图3 灭活的细菌与白假丝酵母菌液体共培养中白假丝酵母菌的生长变化曲线

Fig 3 Growth curve of *Saccharomyces albicans* in mixed culture with killed bacteria

3 讨论

白假丝酵母菌是一种常见的人类共栖菌, 常见于口腔、消化道黏膜。白假丝酵母菌是一种条件致病菌, 当机体发生菌群失调或抵抗力下降时可引起白假丝酵母菌病, 为该类感染的主要菌群^[5]。传统观点认为白假丝酵母菌病的发病机制是一些可产生抗菌物质的口腔正常菌群被抑制, 从而导致白假丝酵母菌过度繁殖^[6]。早期研究^[7]认为: 细菌与白假丝酵母菌呈拮抗关系是通过争夺营养物、生长因子等生长繁殖所需的物质。Vilchez等^[8]研究表明变异链球菌可通过分泌脂肪酸信号分子改变白假丝酵母菌的形态转变。近年来的研究热点是细菌通过竞争黏膜上皮细胞的表面受体, 影响白假丝酵母菌的定植^[9]。

其他可能的拮抗机制如某些口腔细菌是否产生抗念珠菌物质或一些代谢产物来改变白假丝酵母菌生长环境等, 目前少见报道。本课题组前期研究发现口腔常驻放线菌在体外均可抑制白假丝酵母菌的生长繁殖, 即对后者产生拮抗作用。放线菌的上清液对白假丝酵母菌的生长有明显抑制作用^[2]。在本研究中, 选取了3种常见口腔链球菌(唾液链球菌、变异链球菌、血链球菌)来观察其在体外与白假丝酵母菌的关系。研究结果初步证实: 唾液链球菌、变异链球菌和血链球菌在体外均可抑制白假丝酵母菌的生长繁殖, 即对后者产生拮抗作用。在直接点种法中, 各组均有明显的抑菌圈, 提示这些细菌可能分泌某种抗菌物质。而在反点种菌落计数法中, 由于变异链球菌和血链球菌数目过多, 难以观察到明显的抑菌圈。为进一步了解拮抗作用机制, 本研究将上述3种细菌与白假丝酵母菌共同置于液体培养基中, 解决了平板培养基中可能存在营养不足的问题。3种链球菌和上清液分别与白假丝酵母菌共培养的实验结果说明: 无论是活菌体还是其分泌的上清液对白假丝酵母菌均有明显的抑制作用。但是, 尚不

能肯定何种细菌作用更强。根据各实验组白假丝酵母菌菌落数生长变化曲线,在72或96 h后,这种抑制作用呈现衰减趋势。推测这种抑制作用的衰减与细菌的生长繁殖周期以及物理化学环境的改变有关。最后,为明确此种拮抗作用是否还有可能来源于细菌组成成分,将3种无分泌功能的灭活菌体和白假丝酵母菌进行共同培养,但该法所得数据不稳定,波动性较大。

目前有不少关于链球菌抗菌物质的报道,如变异链球菌可通过代谢产生脂肪酸改变环境pH值,从而抑制其他细菌生长;血链球菌通过产生较高浓度的H₂O₂杀灭细菌^[10],同时可分泌血链素拮抗牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌等^[11-12];变异链球菌分泌变链素能杀灭血链球菌和黏性放线菌^[13]等。今后的研究应进一步了解链球菌和白假丝酵母菌相互作用的机制,借助生物学手段科学地筛选出有效的拮抗物质并运用于白假丝酵母菌感染的临床治疗上。口腔细菌种类繁多,细菌之间相互作用的研究还有待深入,这将对重建口腔有益菌群的优势状态、口腔黏膜疾病的预防和治疗具有很大帮助。

[参考文献]

- [1] Ahn HS, Cho W, Kang SH, et al. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of alpha helical domain of Tenecin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study[J]. Peptides, 2006, 27(4) :640-648.
- [2] 李多, 肖晓蓉, 朱殊, 等. 口腔放线菌对白假丝酵母菌拮抗作用的体外实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(5) :553-555.
LI Duo, XIAO Xiao-rong, ZHU Zhu, et al. Study the inhibitory effects of three oral Actinomyces on growth of oral *Candida albicans* in vitro[J]. West China J Stomatol, 2008, 26(5) :553-555.
- [3] 邓金华, 卫德安, 张志坤, 等. 草绿色链球菌A19抑制脑膜炎双球菌生长的机理研究[J]. 疾病控制杂志, 1999, 3(1) :23-24.
DENG Jin-hua, WEI De-an, ZHANG Zhi-kun, et al. Study on

- the mechanism for *Streptococcus viridans* A19's inhibiting the growth of neisseria meningitidis[J]. Chinese J Disease Control Prevention, 1999, 3(1) :23-24.
- [4] 于淼, 陆峻君, 张朝良, 等. 口腔链球菌对伴放线嗜血菌生长影响的体外实验[J]. 临床口腔医学杂志, 2008, 24(12) :727-730.
YU Miao, LU Jun-jun, ZHANG Chao-liang, et al. Influence of oral streptococci on *H. actinomycetemcomitans* in growth in vitro[J]. J Clin Stomatol, 2008, 24(12) :727-730.
 - [5] Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms[J]. Arch Oral Biol, 2006, 51(8) :672-680.
 - [6] Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: An update for the general practitioner[J]. Aust Dent J, 2010, 55(Suppl 1) :48-54.
 - [7] Basson NJ. Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culture in a chemostat[J]. J Med Microbiol, 2000, 49(11) :969-975.
 - [8] Vílchez R, Lemme A, Ballhausen B, et al. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid(SDSF)[J]. Chembiochem, 2010, 11(11) :1552-1562.
 - [9] Bamford CV, d' Mello A, Nobbs AH, et al. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication[J]. Infect Immun, 2009, 77(9) :3696-3704.
 - [10] Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: Microbial communities and their role in the shift from oral health to disease[J]. Clin Oral Investig, 2003, 7(4) :181-188.
 - [11] Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: A critical assessment[J]. J Periodontal Res, 1991, 26(3 Pt 2) :195-212.
 - [12] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides[J]. J Immunol Methods, 1991, 137(2) :167-173.
 - [13] Balakrishnan M, Simmonds RS, Kilian M, et al. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages[J]. J Med Microbiol, 2002, 51(11) :941-948.

(本文编辑 李彩)

(上接第301页)

- dent induction of cyclin D1 by retinoblastoma protein(pRB) family proteins and tumor-derived pRB mutants[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17) :14897-14905.
- [5] Wong SC, Chan JK, Lee KC, et al. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. J Pathol, 2001, 194(1) :35-42.
 - [6] Yang M, Wu S, Su X, et al. JAZ mediates G1 cell-cycle arrest and apoptosis by positively regulating p53 transcriptional activity[J]. Blood, 2006, 108(13) :4136-4145.
 - [7] Zhou CJ, Zhang QH, Zhang TG, et al. Expression of ER, Ki-67 and cyclinD1 in the pre-cancerous breast of Chinese patients[J]. Pathol Oncol Res, 2009, 15(2) :153-158.

- [8] Hameed O, Ghali VS, Tartter PI, et al. Immunohistochemical staining for cyclin D1 and Ki-67 aids in the stratification of atypical ductal hyperplasia diagnosed on breast core biopsy[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(6) :862-872.
- [9] Gupta VK, Feber A, Xi L, et al. Association between CCND1 G/A870 polymorphism, allele-specific amplification, cyclin D1 expression, and survival in esophageal and lung carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(23) :7804-7812.
- [10] Hastings RH, Montgrain PR, Quintana R, et al. Cell cycle actions of parathyroid hormone-related protein in non-small cell lung carcinoma[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(4) :L578-L585.

(本文编辑 汤亚玲)