

[文章编号] 1000-1182(2010)04-404-04

不同龋敏感儿童口腔变异链球菌 不同基因型临床分离株产酸力的实验研究

刘兴容¹ 李静²

(1. 泸州医学院附属口腔医院 口腔内科, 四川 泸州 646000;

2. 西安交通大学口腔医院 第一门诊部, 陕西 西安 710048)

[摘要] 目的 比较不同龋敏感儿童口腔变异链球菌不同基因型临床分离株对蔗糖进行酵解产生有机酸的能力。方法 从不同龋敏感的3~5岁学龄前儿童口腔变异链球菌中选取66株变异链球菌临床分离株, 用气相色谱法测定高龋、中龋和无龋儿童口腔变异链球菌不同基因型临床分离株产生各有机酸的量。结果 不同龋敏感儿童不同基因型变异链球菌临床分离株产生有机酸的量的差异有统计学意义($P<0.05$), 同一龋敏感儿童变异链球菌携带不同基因型菌株产酸量的差异也有统计学意义($P<0.05$), 携带基因型数目越多的菌株其产酸量越多。变异链球菌临床分离株产生乳酸、乙酸、甲酸的量的差异有统计学意义($P<0.05$), 乳酸多于乙酸和甲酸。结论 不同龋敏感儿童口腔变异链球菌不同基因型菌株产酸力不同, 携带基因型数目越多的菌株其产酸力越强。

[关键词] 龋齿; 乳牙; 变异链球菌; 基因型; 有机酸

[中图分类号] R 781.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.04.016

Analyzing the production of organic acid of different genotype *Streptococcus mutans* isolated from children with different caries experience LIU Xing-rong¹, LI Jing². (1. Dept. of Oral Medicine, Hospital of Stomatology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. The First Out-patient Department, Hospital of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710048, China)

[Abstract] **Objective** To compare the production of organic acid of different genotype *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) isolated from children with different caries experience. **Methods** 66 strains of *S. mutans* isolated from dental plaques of children aged from 3 to 5 with different caries experience were chosen as test bacteria. The quantities of organic acid include formic acid, acetic acid and lactic acid which produced by different genotype of *S. mutans*, were measured by gas chromatograph. **Results** There were significant difference in production of organic acid among the different genotypes of *S. mutans* isolated from children with different caries susceptibility, and so were the strains isolated from children within the same caries susceptibility ($P<0.05$). The more genotypes the strain had, the more organic acid it produced ($P<0.05$). Among all the organic acid, the quantity of lactic acid was much more than that of formic acid and acetic acid. **Conclusion** There were significant difference in the ability of the strains with different genotypes to produce organic acid, and the more genotypes it has, the more organic acid it produced.

[Key words] dental caries; deciduous tooth; *Streptococcus mutans*; genotype; organic acid

乳牙龋是儿童口腔常见的多发病。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)血清型c型菌株是与乳牙龋关系最密切的致龋菌之一。变异链球菌产生乳酸等有机酸引起牙齿脱矿被认为是其最直接的致龋机制。研究表明, *S. mutans*在pH 5.5时仍然能够产生较多的酸, 这有助于维持菌斑的低pH环境, 使

牙面脱矿直至破坏^[1]。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是产生乳酸的关键酶, 是*S. mutans*重要的产酸毒力因子。杨德琴等^[2]在探讨*S. mutans*血清型c型临床株LDH基因多态性与细菌致龋力及酶活性的关系时发现, 该毒力因子基因具有遗传多态性, 不同基因型菌株可在一定程度上改变乳酸产生能力, 进而影响菌株的致龋性。李伟等^[3]在对成人不同龋敏感者口腔*S. mutans*基因型与产酸性之间的关系研究中, 通过对不同基因型*S. mutans*代谢产物pH值的检测, 发现基因型越多的菌株其产酸能力越

[收稿日期] 2009-08-04; [修回日期] 2010-02-23

[基金项目] 四川省教育厅科研基金资助项目(2002A070)

[作者简介] 刘兴容(1968—), 女, 四川人, 教授, 硕士

[通讯作者] 刘兴容, Tel: 0830-3109505

强。研究^[4-5]表明, *S.mutans*的数量在致龋过程中并不是唯一的决定因素, 菌株间的差异可能也是其中的一个因素。不同龋敏感儿童口腔中*S.mutans*不同基因型菌株是否存在同样的关系, 目前国内外还未见相关报道。本研究拟采用气相色谱法对高龋、中龋、无龋儿童口腔*S.mutans*不同基因型菌株有机酸代谢产物进行定性与定量分析, 初步探讨不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型菌株之间产酸力是否存在差异, 为有效预防乳牙龋提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

从不同龋敏感的3~5岁学龄前儿童口腔*S.mutans*中选取66株*S.mutans*临床分离株(23种基因型)为实验菌株。66株*S.mutans*临床分离株中, 高龋组(dmft \geq 6)31株, 其中携带1种基因型者5株, 2种基因型22株, 3种基因型4株; 中龋组(6>dmft \geq 4)22株, 其中携带1种基因型3株, 2种基因型19株; 无龋组(dmft=0)13株, 只有1种基因型。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备 将*S.mutans*不同基因型临床株分别接种于轻唾(mitis salivarius, MS)培养基, 37℃、厌氧(80% N₂、10% H₂、10% CO₂)复苏48 h, 收集菌落做生化鉴定, 确定为纯培养后挑取单个菌落转种于脑心浸液(brain-heart infusion, BHI)液体培养基增菌, 厌氧培养24 h, 离心收集细菌, 无菌生理盐水洗2次, 于紫外分光光度计540 nm处制备成光密度值为1.0的菌悬液。取100 μ L *S.mutans*菌悬液接种于10 mL含1%蔗糖的BHI液体培养基中, 空白培养基作为阴性对照, 37℃厌氧培养32 h, 备用。

1.2.2 配制标准有机酸 挥发性有机酸: 乙酸5.78 mL, 甲酸3.67 mL, 加蒸馏水至100 mL稀释, 使各酸的含量为10 mmol \cdot L⁻¹。非挥发性有机酸: 乳酸1.35 mL, 加蒸馏水至100 mL稀释, 使乳酸的含量为10 mmol \cdot L⁻¹。

1.2.3 提取代谢有机酸产物 挥发性有机酸: 取各菌株培养物2 mL于一带塞小试管中, 加50%硫酸0.2 mL、乙醚1 mL盖紧塞子, 来回倒转20次充分混匀, 1 000 r \cdot min⁻¹离心10 min, 置试管于-20℃冰箱至试管底部水结冰, 迅速倒出乙醚于另一试管, 取1 μ L作色谱分析。非挥发性有机酸: 取各菌株培养物1 mL于一带塞小试管中, 加50%硫酸0.4 mL、甲醇2 mL盖紧塞子, 55℃水浴过夜, 取出试管加蒸馏水1 mL、氯仿0.5 mL, 来回倒转20次充分混匀, 1000 r \cdot min⁻¹离心10 min, 吸取底部氯仿层1 μ L作色谱分析。标准酸和空白培养基也用同样方法提取,

取1 μ L作色谱分析。

1.2.4 色谱分析条件 色谱柱为玻璃毛细管柱SE-30(25 m \times 0.2 mm \times 0.25 μ m); 柱温150℃保持8 min, 4℃ \cdot min⁻¹升温至200℃保持2 min; 载气为高纯氮气, 流量1.4 mL \cdot min⁻¹(0.12 MPa); 补充气为氮气, 流量70 mL \cdot min⁻¹; 分流比1:10; 燃烧气为氢气, 流量40 mL \cdot min⁻¹; 助燃气为氧气, 流量500 mL \cdot min⁻¹; 检测器为氢火焰离子化检测器, 检测器温度280℃, 气化室温度25℃, 辅助温度280℃; 进样量1 μ L。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5软件进行统计分析, 对不同龋敏感儿童口腔变异链球菌高龋组、中龋组中不同基因型临床分离株产生有机酸的量进行单因素方差分析, 对不同龋敏感儿童口腔变异链球菌不同基因型临床分离菌株的产酸能力进行配伍设计的方差分析。

2 结果

2.1 各酸的保留时间

以各有机酸标准品进样, 采集数据, 得到各酸的保留时间为: 乳酸3.877 min, 乙酸4.192 min, 甲酸3.598 min。

2.2 *S.mutans*不同基因型临床分离株产乳酸量

不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产乳酸量见表1。统计分析表明, 1)不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*临床株产乳酸量的差异有统计学意义($F=2.761$, $P<0.05$); 2)同一龋敏感儿童*S.mutans*携带不同基因型数目菌株产乳酸量的差异有统计学意义(高龋组 $F=3.665$, $P<0.05$; 中龋组 $F=5.019$, $P<0.05$), 菌株所携带的基因型数目越多, 其产生乳酸的量也越多。

表1 不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产乳酸量(mm \cdot L⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The quantity of lactic acid produced by different genotype *S.mutans* isolated from children with different caries experience (mm \cdot L⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

分组	乳酸量		
	1种基因型菌株	2种基因型菌株	3种基因型菌株
高龋组	6.160 \pm 0.209	6.237 \pm 0.197	6.435 \pm 0.250
中龋组	5.915 \pm 0.152	6.114 \pm 0.218	-
无龋组	5.902 \pm 0.288	-	-

2.3 *S.mutans*不同基因型临床分离株产乙酸量

不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产乙酸量见表2。统计分析表明, 1)不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*临床株产乙酸量的差异有统计学意义($F=2.589$, $P<0.05$); 2)同一龋敏感儿童*S.mutans*

携带不同基因型数目菌株产乙酸量的差异有统计学意义(高龋组 $F=5.788$, $P<0.05$; 中龋组 $F=3.556$, $P<0.05$), 菌株所携带的基因型数目越多, 其产生乙酸的量也越多。

表 2 不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产乙酸量($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The quantity of acetic acid produced by different genotype *S.mutans* isolated from children with different caries experience ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

分组	乙酸量		
	1种基因型菌株	2种基因型菌株	3种基因型菌株
高龋组	2.091±0.296	2.208±0.408	2.339±0.302
中龋组	2.016±0.173	2.178±0.280	-
无龋组	1.983±0.272	-	-

2.4 *S.mutans*不同基因型临床分离株产甲酸量

不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产甲酸量见表3。统计分析表明, 1)不同龋敏感儿童*S.mutans*临床分离株产甲酸量的差异有统计学意义($F=2.641$, $P<0.05$); 2)同一龋敏感儿童*S.mutans*携带不同基因型数目菌株产甲酸量的差异有统计学意义(高龋组 $F=3.692$, $P<0.05$; 中龋组 $F=4.482$, $P<0.05$), 菌株所携带的基因型数目越多, 其产生甲酸的量也越多。

表 3 不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*不同基因型临床株产甲酸量($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The quantity of formic acid produced by different genotype *S.mutans* isolated from children with different caries experience ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

分组	甲酸量		
	1种基因型菌株	2种基因型菌株	3种基因型菌株
高龋组	1.607±0.013	1.623±0.052	1.649±0.042
中龋组	1.603±0.020	1.621±0.044	-
无龋组	1.599±0.066	-	-

2.5 *S.mutans*临床分离株产有机酸量的比较

不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*产乳酸、乙酸、甲酸的量见表4。

表 4 不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*产乳酸、乙酸、甲酸的量($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of quantity of lactic acid, acetic acid and formic acid produced by *S.mutans* isolated from children with different caries experience($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

分组	乳酸	乙酸	甲酸
高龋组	6.241±0.236	2.155±0.209	1.622±0.027
中龋组	6.068±0.227	2.133±0.169	1.610±0.025
无龋组	5.902±0.288	1.983±0.272	1.599±0.066

统计分析表明, *S.mutans*临床分离株产生乳酸、乙酸、甲酸的量的差异有统计学意义(乳酸与甲酸、乳酸与乙酸、乙酸与甲酸的 F 值分别为8.957、6.384、6.162, $P<0.05$), 乳酸多于乙酸和甲酸。

3 讨论

*S.mutans*的致龋作用主要是通过产酸等毒力因子来完成。*S.mutans*为发酵代谢型有机营养菌, 是牙菌斑生物膜中产酸力最强的细菌之一, 通过糖酵解等途径在短时间内产生大量乳酸等有机酸, 并在菌斑内积累, 使局部牙齿表面pH值降低, 当pH低于临界值(5.0~5.5)时导致牙齿脱矿、产生龋蚀。

本研究以学龄前儿童为研究对象, 在前期对不同龋敏感儿童口腔*S.mutans*临床分离株基因分型实验研究^[6]的基础上, 选取不同龋敏感儿童口腔66株*S.mutans*临床分离株(23种基因型)作为实验菌株, 采用气相色谱法检测产酸力。本实验之所以选择气相色谱法是由于*S.mutans*产生的有机酸量很少, 而该方法具有高选择性、高分辨率、高灵敏度等特点。研究结果表明, 不同龋敏感儿童*S.mutans*的产酸力不同, 基因型数目越多的菌株产生有机酸的能力越强, 所产生的有机酸中乳酸多于乙酸和甲酸。

在前期实验^[6]研究发现, 高龋儿童菌斑中分离得到的*S.mutans*菌株多于中龋组和无龋组, 而有机酸的产生是*S.mutans*酵解蔗糖所致。杨德琴等^[7]对不同龋敏感人群*S.mutans* LDH活性进行了研究, 发现LDH活性菌株在不同龋敏感人群的分布是不同的, 在高龋人群中, 高活性的LDH菌株的比例比无龋人群高。本实验结果表明, 不同龋敏感儿童*S.mutans*临床分离株产生的有机酸中, 乳酸多于乙酸和甲酸, 高龋组多于中龋组和无龋组, 也提示高龋人群的*S.mutans*可能具有高活性的LDH。

本实验中发现, 基因型数目越多的菌株产生有机酸的能力越强, 与国内外学者研究结果一致。黄晓晶等^[8]在探讨成人*S.mutans*基因型与龋发生的关系时发现, *S.mutans*个体菌株携带基因型的种类数与其致龋性密切相关, 基因型越多, 菌株的致龋性越强。Napimoga等^[9]研究发现, 分离自同一高龋组个体的不同基因型菌株在低pH时其产酸能力不同, 有的菌株同分离自无龋组个体的菌株一样不能产酸, 但在不同基因型菌株中常有1~2株仍能较好生长并继续产酸, 高龋组个体定植的产酸性强的菌株所占比例显著高于无龋组。他推测, 高龋患者高发龋的原因可能是由于其携带有某些特定类型的基因型菌株或频繁进食酸性碳水化合物的结果, 也可能是其定植的多种致龋基因型种类的变异链球菌菌株共同

增加患龋风险的结果。

本研究结果表明,不同龋敏感儿童口腔中分离出的*S.mutans*基因型的数目有差异,龋敏感性越高者定植的*S.mutans*基因型种类也越多。高龋者携带较多的*S.mutans*基因型提示个体携带*S.mutans*基因型数目与其龋易感性密切相关。在龋发生的过程中,高龋敏感者个体所携带的部分产酸能力强的*S.mutans*菌株的作用可能占重要地位,基因型或其表达的差异可能是导致菌株致龋性能差异的原因。由于本实验选择的菌株数较少,今后还需要加大实验菌株的量作进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Dong YM, Pearce EI, Yue L, et al. Plaque pH and associated parameters in relation to caries[J]. *Caries Res*, 1999, 33(6) :428-436.
- [2] 杨德琴, 刘天佳, 李颂, 等. 变形链球菌临床分离株乳酸脱氢酶遗传多态性研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2006, 37(5) :781-784.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, LI Song, et al. A study of genetic diversity in lactate dehydrogenase of *Streptococcus mutans* from clinical isolates[J]. *J Sichuan University: Medical Science Edition*, 2006, 37(5) :781-784.
- [3] 李伟, 贺新兰, 胡红梅, 等. 不同龋敏感者口腔变形链球菌基因型与产酸性之间的关系[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(6) :500-503.
LI Wei, HE Xin-lan, HU Hong-mei, et al. Association between genotype and acidogenicity of *Streptococcus mutans* in subjects with different caries susceptibility[J]. *J Fourth Military Medical*

- University, 2008, 29(6) :500-503.
- [4] Powell LV. Caries risk assessment: Relevance to the practitioner[J]. *J Am Dent Assoc*, 1998, 129(3) :349-353.
- [5] Yamashita Y, Tsukioka Y, Nakano Y, et al. Molecular and genetic analysis of multiple changes in the levels of production of virulence factors in a subcultured variant of *Streptococcus mutans* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 144(1) :81-87.
- [6] 李伟, 刘兴容, 曹元书, 等. 不同龋敏感儿童口腔变形链球菌基因型的初步研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2007, 21(6) :596-598.
LI Wei, LIU Xing-rong, CAO Yuan-shu, et al. Experimental study on genotype of *Streptococcus mutans* in different caries-susceptible children[J]. *J Modern Stomatol*, 2007, 21(6) :596-598.
- [7] 杨德琴, 刘天佳, 周学东, 等. 不同龋敏感人群变形链球菌分离株乳酸脱氢酶活性的初步研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(2) :116-118.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, ZHOU Xue-dong, et al. Study on lactate dehydrogenase activity of *Streptococcus mutans* isolates derived from caries-active and caries-free individuals[J]. *West China J Stomatol*, 2005, 23(2) :116-118.
- [8] 黄晓晶, 刘天佳, 陈舟, 等. 变形链球菌(血清型C)临床分离株AP-PCR基因分型[J]. *中华口腔医学杂志*, 2001, 36(4) :281-284.
HUANG Xiao-jing, LIU Tian-jia, CHEN Zhou, et al. Typing of *Streptococcus mutans*(serotype C) by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. *Chin J Stomatol*, 2001, 36(4) :281-284.
- [9] Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 7) :697-703.

(本文编辑 李彩)

(上接第403页)

- [2] Anthony L. Maganzini, 曾应魁, Josh Z. Epstein, 等. 应用数字图象处理技术对颌面审美观的研究[J]. *口腔正畸学*, 2000, 7(3) :107-110.
Anthony L. Mananzini, ZENG Ying-kui, Josh Z. Epstein, et al. Perception of facial esthetics by native Chinese and American orthodontists utilizing manipulated digital imagery techniques[J]. *Chin J Orthod*, 2000, 7(3) :107-110.
- [3] 唐国华, 嵇国平, 丁小军. 上海地区650人对软组织侧貌唇突度的审美评价[J]. *上海口腔医学*, 2003, 12(2) :99-102.
TANG Guo-hua, JI Guo-ping, DING Xiao-jun. Study on perception of Shanghai population with labial profile[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2003, 12(2) :99-102.
- [4] 吕婴, 张学军. 中国人颜面侧貌审美的调查分析[J]. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(3) :224-226.
LÜ Ying, ZHANG Xue-jun. Analysis of facial profile preferences among the Chinese population[J]. *Chin J Stomatol*, 2000, 35(3) :224-226.
- [5] 林久祥. 现代口腔正畸学[M]. 2版. 北京:中国医药科技出版社, 1994 :42.
LIN Jiu-xiang. *Modern orthodontics*[M]. 2nd ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1994 :42.

- [6] Morris DO, Illing HM, Lee RT. A prospective evaluation of Bass, Bionator and Twin Block appliances. Part —the soft tissues[J]. *Eur J Orthod*, 1998, 20(6) :663-684.
- [7] Oliver BM. The influence of lip thickness and strain on upper lip response to incisor retraction[J]. *Am J Orthod*, 1982, 82(2) :141-149.
- [8] Holdaway RA. A soft-tissue cephalometric analysis and its use in orthodontic treatment planning. Part [J]. *Am J Orthod*, 1983, 84(1) :1-28.
- [9] Yogosawa F. Predicting soft tissue profile changes concurrent with orthodontic treatment[J]. *Angle Orthod*, 1990, 60(3) :199-206.
- [10] Denis KL, Speidel TM. Comparison of three methods of profile change prediction in the adult orthodontic patient[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1987, 92(5) :396-402.
- [11] 孙少宣. 口腔医学美学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1994 :171-201.
SUN Shao-xuan. *Aesthetic dental medicine*[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1994 :171-201.

(本文编辑 李彩)