

基础研究

特异性抗变形链球菌鸡蛋黄抗体 IgY
对定菌鼠龋齿发生的影响

樊明文 江千舟 边 专 李宇红 刘宁慧

【摘要】目的 研究特异性抗变形链球菌鸡蛋黄抗体对定菌鼠龋齿发生、发展的影响。方法 将35只Wistar大鼠随机分为5组,接种耐链霉素的 *S. mutans* MT 8148,并给予致龋饲料,使用特异性抗变链的鸡蛋黄抗体IgY通过不同方式对实验动物进行被动免疫。实验结束后,根据 Keyes 评分方法作龋齿计分,并采用 *t* 检验进行统计分析。结果 在食物中添加特异性 IgY冻干粉或经口腔喷雾 IgY漱口水均能显著降低大鼠牙釉质及牙本质外层龋齿计分。给予含特异性抗体的鸡蛋黄饮食能减低龋齿的发生,但与对照组比较无显著性差异。结论 特异性抗变链的鸡蛋黄抗体 IgY能减少定菌鼠龋齿的发生,减缓龋齿的发展。

【关键词】 龋病; 定菌鼠; 变形链球菌

The Study on Specific Anti-*Streptococcus mutans* IgY Against Dental Caries in Rats

FAN Mingwen*, JIANG Qianzhou, BIAN Zhuan, et al. (*Department of Endodontics, College of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of specific anti-*streptococcus mutans* IgY against *streptococcus mutans* on dental caries development in rats. **Methods** 35 wistar rats were divided into 5 groups: group A received IgY gargle; group B received IgY lyophilized powder; group C received sterilized water as control; group D and E received egg yolk food with or without specific IgY individually. They were all fed with caries-inducing diet 2000#. The number of caries scores was counted by the procedure of Keyes. **Results** There was a significant lower mean of caries scores in groups treated with IgY lyophilized powder and gargle. By treating with egg-yolk food contained specific IgY, the mean of caries scores decreased comparing with no treatment group. **Conclusion** Local passive immunization with specific anti-*streptococcus mutans* IgY may be an effective way to prevent the development of dental caries.

【Key words】 caries; gnotobiotic rats; *streptococcus mutans*

长期以来人们致力于龋病预防的研究,早在20世纪60年代末已有学者提出了防龋疫苗的构想,期望通过疫苗有效的阻止致龋菌在宿主口腔内的定居与粘附,达到防龋目的。被动免疫因能避免主动免疫的一些副作用而日益被人们接受¹。本课题组在前期研究中,采用变形链球菌葡糖基转移酶(*glucosyl-transferase*, GTF)过表达株 *S. mutans* B29-33 作为全菌抗原免疫母鸡,成功的从鸡蛋黄中提取了特异性抗变形链球菌鸡蛋黄抗体 IgY(下面简称抗变链 IgY)。在此基础上,本实验将抗变链 IgY用于定菌鼠的口腔局部被动免疫,以观察抗变链 IgY对定菌鼠龋齿发生及发展的影响。

1 材料和方法

1.1 细菌及培养条件

S. mutans MT8148(武汉大学口腔医学院实验中心保存)细菌复苏后,在厌氧环境(85% N₂、10% H₂、5% CO₂)条件下,连续培养于硫酸链霉素浓度递增的BHI培养基中,至耐药浓度达1500 mg/L。

1.2 抗变链 IgY漱口水的制备

将特异性抗变链 IgY冻干粉² 0.25 g溶于100 ml无菌蒸馏水中,直径0.22 μm的滤孔滤膜过滤除菌,存入喷液瓶中,4℃下保存备用。

1.3 致龋饲料2000#制备

每1000 g食物含全麦粉60 g,蔗糖560 g,精炼奶粉280 g,豆粉40 g,酵母粉40 g,盐20 g。

1.4 鸡蛋黄致龋食物的配制

鸡蛋黄致龋食物实验组选用 *S. mutans* B29-33 全细胞免疫母鸡免疫后第4至第10周所产的鸡蛋。鸡蛋黄致龋食物对照组鸡蛋选用未免疫母鸡所产鸡蛋。将鸡蛋去除蛋清及蛋

本课题为湖北省科委科技攻关项目(编号982P1602)

作者单位:430079 武汉大学口腔医院牙体牙髓科(樊明文,江千舟,边 专),武汉大学口腔医院中心实验室(李宇红,刘宁慧)

黄膜,收集蛋黄液冷冻干燥。鸡蛋黄致龋食物配方:每1 000 g食物含全麦粉60 g,蔗糖410 g,精炼奶粉280 g,豆粉40 g,酵母粉40 g,盐20 g及蛋黄150 g(约256 ml)。

1.5 抗变链 IgY 免疫定菌鼠方案

选用同一天出生的 Wistar 大鼠(湖北省医学科学院提供)35只,随机分为5组,每组7只(雄性4只,雌性3只)。即A组: IgY 漱口组; B组: IgY 食物添加剂组; C组: 未加 IgY 的对照组; D组: 鸡蛋黄致龋食物实验组; E组: 鸡蛋黄致龋食物对照组。大鼠于出生后23 d 断奶,同时 A, B, C 组给予致龋饲料2000 # , D, E 组分别给予相应的鸡蛋黄致龋食物。所有大鼠均采用含抗生素药物的蒸馏水作为饮用水。各组大鼠编号并称记体重。大鼠第26天龄时改换普通蒸馏水作为饮用水。第27~29天龄,在大鼠牙面上接种浓度为 1×10^{12} CFU/L 的细菌 *S. mutans* MI8148, 每日接种1次,并于饮用水中加入1%的稀释菌液。细菌接种前后采集大鼠口腔内的细菌样本分析,接种后唾液特定细菌量达 1×10^7 CFU/L 以上表明定菌成功。定菌第3天后开始实施被动免疫: A组大鼠口腔每日喷 IgY 漱口水1次,喷雾后禁水30 min; B组在致龋饲料2000 # 中加入1%抗变链 IgY 冻干粉; C组每日给予蒸馏水后禁水30 min; D, E 组继续分别给予相应的鸡蛋黄致龋食物。大鼠鼠龄第70天称重并处死。

1.6 龋齿计分

将大鼠处死,分离颌骨,用0.4%紫尿酸铵染色后切片,于体视显微镜下观察各组磨牙患龋情况。参照 Keyes 经典龋齿计分标准计分, *t* 检验统计分析结果。

2 结 果

2.1 实验前后大鼠的体重

各组大鼠在实验前后体重测定结果见表1, 2。统计分析表明,实验组大鼠增加的体重与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表1 A, B, C 组大鼠实验前后的体重 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The change of rats weight in group A, B and C before and after test ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)		
	实验前	实验后	增加
A	50.43 ±7.70	125.14 ±17.20	74.71 ±16.08
B	49.71 ±7.20	132.86 ±10.07	83.14 ±7.43
C	57.86 ±12.75	133.14 ±23.25	75.29 ±19.24

表2 D, E 组大鼠实验前后的体重 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The change of rats weight in group D and E before and after test ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)		
	实验前	实验后	增加
D	53.14 ±8.75	206.86 ±17.24	154.86 ±16.34
E	53.57 ±13.01	195.5 ±11.06	146.33 ±14.24

2.2 IgY 提取物口腔局部被动免疫大鼠

IgY 提取物口腔局部被动免疫大鼠后龋齿情况见图1~3, Keyes 计分结果见表3。可见 A 组 IgY 漱口组组和 B 组 IgY 食物添加剂组较 C 组未加 IgY 对照组龋齿计分明显降低, 且有显著性差异。A, B 组与 C 组龋损下降率比较表明 A 组龋损有大幅度下降, 牙釉质及牙本质外层 1/4~3/4, 牙釉质及牙本质外层 1/4 及牙釉质的龋坏分别下降 100.00%、81.81%、39.11%。



图1 大鼠非龋齿剖面观 体视显微镜 ×16

Fig 1 Non-carious rats teeth observed from cross section stereomicroscope ×16



图2 大鼠龋齿剖面观, 红色染色表明有龋损(肉眼)

Fig 2 Rats caries observed from cross section, caries have red staining (naked eye)



图3 大鼠龋齿剖面观 体视显微镜 ×16

Fig 3 Rats caries observed from cross section stereomicroscope ×16

表3 A, B, C 组大鼠龋齿计分 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Caries scores of rats in group A, B and C ($\bar{x} \pm s$)

组别	龋齿计分		
	牙釉质及牙本质外层 1/4~3/4	牙釉质及牙本质外层 1/4	牙釉质
A	0.000 0 ±0.000 0 **	4.571 4 ±1.509 6 **	23.142 9 ±4.972 8 *
B	3.285 7 ±1.392 4 **	17.000 0 ±2.690 4 *	30.714 3 ±3.434 5
C	9.000 0 ±0.944 9	25.125 0 ±1.694 9	38.000 0 ±1.653 8

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 含特异性抗体的鸡蛋黄致龋食物被动免疫大鼠
含特异性抗体的鸡蛋黄致龋食物被动免疫大鼠
Keyes 龋齿计分结果见表 4。统计分析表明,给予含
特异性抗体的鸡蛋黄饮食能降低龋病的发生。但鸡
蛋黄致龋食物实验组大鼠龋齿计分与鸡蛋黄致龋食
物对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 4 D,E组大鼠龋齿计分($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Caries scores of rats in group D and E($\bar{x} \pm s$)

组别	龋齿计分		
	牙釉质及牙本质 外层 1/4 ~ 3/4	牙釉质及 牙本质外层 1/4	牙釉质
D	0.000 0 \pm 0.000 0	6.857 1 \pm 1.298 9	21.200 0 \pm 4.317 4
E	1.200 0 \pm 0.800 0	9.000 0 \pm 2.863 6	25.428 6 \pm 1.688 3

3 讨 论

变形链球菌是目前公认的龋病致龋菌^{3,4}。变形
链球菌能发酵蔗糖产酸,耐酸,能在很低的 pH 值下
生存,造成牙齿脱矿⁵。变形链球菌所合成的细胞外
葡聚糖有利于细菌的附着和聚集于牙面获得性膜表
面,更有利于细菌对牙面的破坏。因而,人们使用特
异性抗体中和变形链球菌的毒力因子,以期达到抑制
致龋菌在口腔中的致病性,预防龋病发生的目的。

鸡蛋是人们的日常食品。鸡蛋黄抗体作为生物
制品,局部使用对机体无负面影响。本实验中各组大
鼠生长状况良好,实验组与对照组大鼠在实验前后体
重变化无差异。本实验采用基因工程合成的变形链
球菌 GT 高表达株作为疫苗免疫母鸡,该菌株 GIF 的
表达量为野生型变形链球菌的 5 倍以上⁶,且具有较
强的免疫原性。GIF 在介导变形链球菌对牙面的粘
附过程中发挥着重要的作用。采用 GIF 为免疫原所
诱导的抗 GIF 抗体能阻止变形链球菌对牙面的粘
附⁷。制备的特异性抗变形链球菌 IgY 用于被动免

疫定菌鼠,结果显示特异性 IgY 能降低大鼠龋齿的
发生,延缓龋齿的发展。其中将 IgY 冻干粉直接加入食
物或配制成漱口水用于局部被动免疫大鼠效果较好,
较对照组有显著性差异。漱口水组较对照组在牙釉
质及牙本质外层 1/4 ~ 3/4,牙釉质及牙本质外层 1/4
和牙釉质的龋损下降达 100.00%,81.81%,39.11%。
这表明抗变链 IgY 抗体作用于局部效果较作用于全
身好。它能够在口腔局部范围内抑制细菌的粘附及
产酸能力,对口腔局部防龋起到较好的作用,同时也
表明它作用于全身不引起机体的变化,对机体影响
小。抗变链鸡蛋黄抗体制备工艺简单,容易大规模生
产,用于被动免疫防龋将有良好的前景。

参考文献

- 1 樊明文,张平,边专. 免疫防龋的研究新进展. 中华口腔
医学杂志,1999,34(2):69-72
- 2 Fan Mingwen, Jiang Qianzhou, Bian Zhuan, et al. Isolation of egg
yolk IgY from hens immunized with *S. mutans* B29-33 and *S. sobri-*
nus 6715. *J Comp Stomatol*, 2000,16(3):193-194
- 3 Otake S, Nishihara Y, Makimura M, et al. Protection of rats
against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk anti-
body (IgY). *J Dent Res*, 1991, 70(3): 162-166
- 4 Hamada S, Horikoshi T, Minami T, et al. Oral passive immuniza-
tion against dental caries in rats by use of hen egg-yolk-antibodies
specific for cell. Associated glucosyltransferase of *streptococcus mur-*
tans. *Infect Immun*,1991, 59(11): 4161-4167
- 5 樊明文. 牙体牙髓病学. 北京:人民卫生出版社,2000:11
- 6 边专,樊明文,杜民权,等. 变形链球菌 Glase 高表达株免
疫奶牛应用研究. 口腔医学纵横杂志,1999,15(1):1-3
- 7 Smith DJ, Tauman MA, Ebersole JL. Effect of oral administration
of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. *Infect*
Immun, 1979, 26(1): 82-89

(2001-04-26 收稿,2003-06-02 修回)

(本文编辑 王 晴)

《中国口腔医学年鉴》第十卷出版发行

《中国口腔医学年鉴》第十卷于 2003 年 7 月出版发行。该书由周学东教授主编,全国近 20 所高等院校 70 余名口腔医学专
家、教授组成的编辑委员会编纂,四川科学技术出版社出版。

该书是我国一部口腔医学综合性资料密集型的工具书。1984 年创刊,每两年出版一卷,迄今已出版 10 卷。它集全国生物、
医药类期刊之精华,并精选、综合与口腔医学有关资料,较全面地反映近几年我国口腔医学各学科在临床、科学研究的发展状况
及学术水平、最新研究动态等;反映我国口腔医学教育的发展和口腔医学领域的重大事件等。第十卷设回顾、论坛、文选、述评、
口腔医学题录索引、教育、人物、口腔医学组织机构、记事、特载 9 个栏目。该书适宜于从事口腔医学医疗、教学、科研人员及口腔
医学生等参考阅读。

全书 70 万字,16 开本,精装,每册定价 68.00 元(邮寄需加邮挂费 6.00 元)。需购书者请汇款至:四川成都人民南路三段 14
号(邮编 610041),四川大学华西口腔医学院《中国口腔医学年鉴》编辑部收,并在汇款单附言栏内写明所购书名(卷)、数量。联系
电话:028-85502414,传真:028-85503479,Email:hxkqbj@s@mail.wcums.edu.cn。

《中国口腔医学年鉴》编辑部