

基础研究

外源性单磷酸鸟苷环二聚体防龋的实验研究

闫文娟¹, 杨德鸿², 吴补领¹南方医科大学南方医院¹口腔科,²脊柱骨科, 广东 广州 510515

摘要:目的 初步探讨外源性单磷酸鸟苷环二聚体(c-di-GMP)对大鼠口腔内龋齿的防龋效果。方法 SPF大鼠感染致龋菌后,随机分成3组,分别用外源性c-di-GMP、氟化钠水溶液、质量体积比为0.9%氯化钠给大鼠施药,用唾液取样细菌培养、龋齿记分观察外源性c-di-GMP在动物口内对致龋菌的生长繁殖以及对龋病发生、发展的影响。结果 通过唾液取样进行变形链球菌培养计数,c-di-GMP组与阴性对照组相比,无显著性差别($P>0.05$);Keyes龋齿记分结果显示,c-di-GMP组龋损程度及数量都均少于对照组($P<0.05$),从龋病发展程度看,c-di-GMP组最为缓慢,仅存在釉质和牙本质浅层龋损。结论 外源性c-di-GMP可以有效抑制大鼠龋齿的发生和发展,有望成为一种新型防龋药物。

关键词:单磷酸鸟苷环二聚体; SD大鼠;防龋;动物实验

中图分类号:R781.1 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)05-0639-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.05.011

http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120426.1714.023.html

Exogenous 3', 5'-cyclic diguanylic acid prevents caries formation in rats

YAN Wenjuan¹, YANG Dehong², WU Buling¹¹Department of Stomatology, ²Department of Spine Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of exogenous c-di-GMP in preventing dental caries formation in SD rats. **Methods** Twenty-day-old SD rats with dental caries induced by *S. Mutans* infection were randomly divided into 3 groups for treatment with dental application of exogenous c-di-GMP, NaF solution or 0.9% NaCl, and changes in the bacterial number and scores of dental caries following the treatments were recorded. **Results** Compared with 0.9% NaCl treatment, exogenous c-di-GMP treatment significantly lowered the scores of dental caries on the occlusal surface and smooth surface ($P<0.05$) but produced no obvious effect on the number of bacterial plaques ($P>0.05$). **Conclusion** Exogenous c-di-GMP can be a novel agent for prevention and treatment of tooth decay.

Key words: 3', 5'-cyclic diguanylic acid; dental caries prevention; animal experiment

近年来国内外学者进行了多种防龋措施的实验研究,其中氟化物防龋是研究最多且广为认可的方法。但氟化物防龋有着诸多局限性,如保证氟浓度的稳定性、防止氟的毒副作用以及口腔内耐氟菌株选择性生长^[1]等方面的问题尚未解决。

单磷酸鸟苷环二聚体(c-di-GMP)是细菌中普遍存在的第二信使,我们的前期研究已证实外源性的c-di-GMP可以抑制变形链球菌的多项致龋特性,如:生物膜的形成、产酸、耐酸以及变形链球菌的体外黏附能力^[2-3]。因此,本研究拟以外源性c-di-GMP干预动物口腔,并以氟化钠为阳性对照,比较两者防龋效果,为外源性c-di-GMP作为防龋制剂提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

收稿日期:2012-02-12

基金项目:国家自然科学基金(30672327,81100747)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30672327, 81100747).

作者简介:闫文娟,博士,主治医师,E-mail: ywj918@sohu.com

通信作者:吴补领,教授,主任医师,电话:020-61642021, E-mail: bulingwu@yahoo.com.cn

1.1 主要实验材料

1.1.1 主要试剂 c-di-GMP(Biolog LIFE SCIENCE INSTITUTE,溶于0.9% NaCl中,制备成4 mmol/L储存液,4℃冰箱保存备用。0.2%氟化钠(上海科哲贸易有限公司);4 g/L紫脲酸铵溶液:800 mg紫脲酸铵(北京化工厂)溶于200 ml的700 g/L的乙醇中,混匀,贮存于棕色瓶中,密封、避光保存;杆菌肽(Sigma);轻唾培养基粉(MSB,北京陆桥公司)。

1.1.2 主要仪器 体视显微镜(Nikon,Janpan);浊度计(上海精密仪器仪表有限公司);厌氧培养箱(BUGBOXDUAL,美国)。

1.1.3 实验动物和饲料 SPF级18 d龄雌性Sprague-Dawley大鼠(第四军医大学实验动物中心)。致龋饲料2000^[4]:每100 g中含蔗糖56 g,精炼奶粉28 g,全麦面粉6 g,酵母4 g,苜蓿叶粉3 g,食盐2 g,冻水全干粉1 g。

1.2 实验方法

1.2.1 变形链球菌致龋大鼠模型的建立 大鼠均于出生后21 d断奶,21~23 d鼠龄期间给予含有广谱抗生素(3000 g饲料加氨苄青霉素、氯霉素、羧苄青霉素各1 g)的致龋饲料2000#,其它时间的饲料中不加抗生素,以

降低口腔中微生物的数量。在23 d时用无菌棉签自大鼠牙面采样后接种MSB琼脂培养基以确定没有内源性变形链球菌,随后将大鼠称质量、分组,分笼饲养。同时活化变形链球菌UA159菌种,划线接种于MSB琼脂平板,厌氧培养48 h,挑取单菌落接种至BHI液体培养基,厌氧培养18 h,比浊法调整细菌浓度至 1.0×10^9 CFU/ml。于鼠龄24~27 d期间给大鼠口腔接种调整好的菌液,在每只大鼠下颌牙面缓慢滴加200 μ l菌液,每天接种2次,每次间隔30 min,接种后1 h内禁饮禁食,连续5 d。接种完毕后的第3天再次用无菌棉签涂拭大鼠牙面并接种于MSB琼脂培养基,厌氧培养48 h以确定变形链球菌感染成功^[5-6]。

1.2.2 实验分组及防龋方案 30只SD大鼠随机分为3组,分别用外源性c-di-GMP、0.2%氯化钠、0.9%氯化钠(作为空白对照)处理,每组各10只(表1)。

自28 d起各组分别用外源性c-di-GMP、0.2%氯化钠水溶液、0.9%氯化钠处理(表2)。大鼠取仰卧位,将0.3 ml药物用钝针头注射器注于大鼠牙面及口腔,维持15 s,每天处理1次,处理后30 min内禁饮食。连续处理60 d。

1.2.3 大鼠口腔内变形链球菌的计数^[7] 于变形链球菌

接种后第60天,即89 d鼠龄时,记录体质量,麻醉大鼠(肌肉注射861合剂,0.75 mg/kg)。用无菌棉签涂拭大鼠上颌磨牙牙面1 min后,立即置入2 ml无菌PBS中,超声震荡10 s。取102倍稀释液0.1 ml涂于MSB琼脂培养基。厌氧培养48 h,根据菌落形态和生化鉴定作变形链球菌菌落计数,每个稀释度重复3次,取平均值。

1.2.4 龋齿计分 实验结束后,处死大鼠,断颈,置高压蒸汽锅中处理3 min,去除软组织,分离上下颌骨,清洗后室温干燥。然后置于40 g/L紫脲酸铵溶液中染色过夜。彻底清洗后室温下避光干燥,沿咬牙合面近远中向片切,体视显微镜下进行龋齿评分。每个样本重复3次,由同一实验者完成。

1.2.5 Keyes 龋齿评分标准^[8] 为便于统计,将大鼠上下颌磨牙分为若干牙面单位如下。

按照龋损程度可分为4级:釉质龋指龋坏仅累及牙釉质;轻度牙本质龋指龋坏累及牙釉质及牙本质外层1/4以内;中度牙本质龋指龋坏累及牙釉质及牙本质外层1/4-3/4之间;重度牙本质龋指龋坏累及牙釉质及牙本质厚度的3/4。

1.2.6 统计学分析 各组数据利用Origin 7.0软件采用方差分析进行比较。

表1 大鼠上下颌磨牙牙面分组

Tab.1 Grouping of molar tooth surface of the SD rats (n=10)

	上颌磨牙牙面单位				下颌磨牙牙面单位			
	颊面	舌面	咬合面	邻接面	颊面	舌面	咬合面	邻接面
第1磨牙	6	6	5	1	6	6	7	1
第2磨牙	4	4	3	2	4	4	5	2
第3磨牙	3	3	2	1	4	4	2	1

表2 各组大鼠磨牙龋齿计分值

Tab.2 Scores of dental caries on the molars of the SD rats (Mean \pm SD)

分组	咬牙合面龋		光滑面龋	
	釉质	牙本质	釉质	牙本质
氯化钠	19.20 \pm 3.42	16.00 \pm 4.36	4.80 \pm 3.49	1.80 \pm 1.64
c-di-GMP	10.17 \pm 3.90*	10.00 \pm 2.64*	1.25 \pm 1.60*	0.33 \pm 0.98
氟化钠	11.17 \pm 5.38*	10.33 \pm 5.39*	1.17 \pm 1.33*	0.60 \pm 1.87

与氯化钠组(阴性对照)相比, *P<0.05

2 结果

2.1 大鼠一般状况

实验中大鼠食物、水消耗,各组间未见明显差异,保证了各组大鼠所受致龋攻击性相同。药物处理期间,大鼠口腔黏膜未见红斑、肿胀等异常表现。实验开始时,各组间大鼠体质量差异无统计学意义;实验期间,大鼠体质量均匀增加;实验结束各组间大鼠体质量增加差异无统计学意义。

2.2 大鼠口腔变形链球菌计数结果

唾液变形链球菌计数(图1),经统计分析,氟化钠组与氯化钠组、外源性c-di-GMP组相差显著(P<0.05),c-di-GMP组同氯化钠对照组相比相差不明显。

2.3 各组大鼠龋齿记分分析

用Keyes龋齿记分法在体视显微镜下观察到各实验组大鼠磨牙存在光滑面(颊面、舌面)和咬牙合面的龋损,龋损部位呈粉红色,而无龋部位几乎不着色。结果

图2~3显示,c-di-GMP和氟化钠组大鼠的咬合面釉质龋、牙本质龋,光滑面釉质龋与对照组氯化钠相比有显著降低($P<0.05$)。

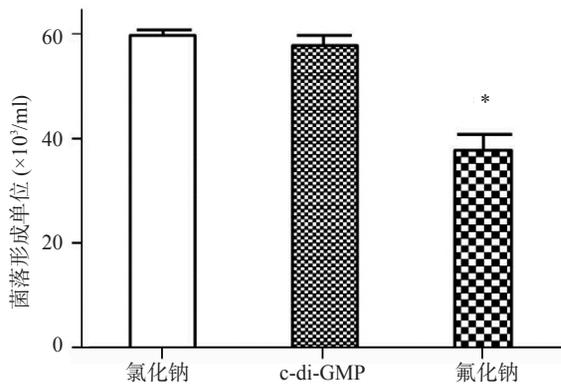


图1 大鼠口腔感染变形链球菌,各实验组处理89 d时变形链球菌计数结果与氯化钠组相比,* $P<0.05$
Fig.1 Number of *S. mutans* plaques in the 3 groups.

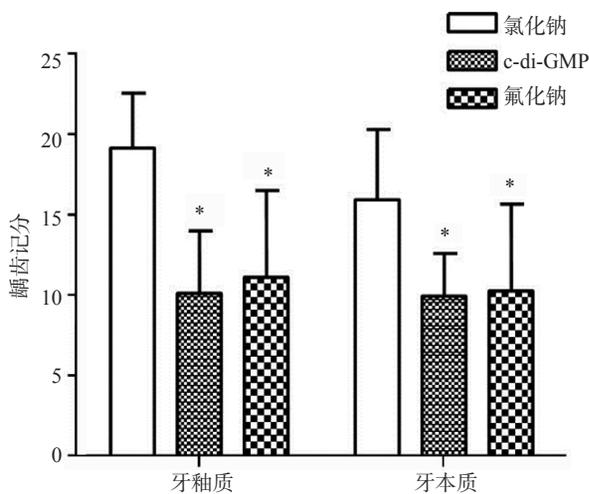


图2 各组大鼠防龋89 d后咬合面的龋齿计分值与氯化钠组相比,* $P<0.05$
Fig.2 Scores of dental caries on the occlusal surface.

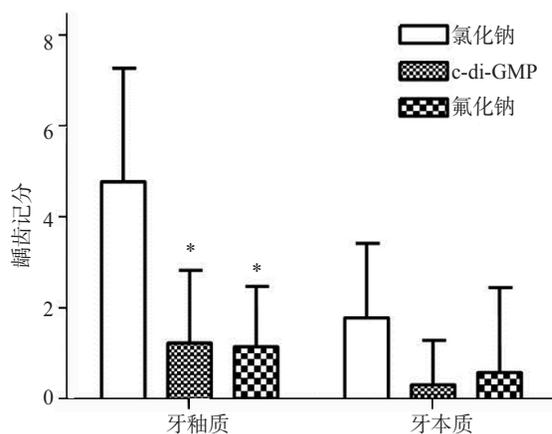


图3 各组大鼠防龋89 d后光滑面的龋齿计分值与氯化钠组相比,* $P<0.05$
Fig.3 Scores of dental caries on smooth surface.

3 讨论

c-di-GMP是原核细胞信号转导中一类新的第二信使,广泛存在于多种细菌,并涉及到多方面的作用,如:参与生物膜的形成,调节毒力因子的表达及在生物体表面的黏附等^[9-11]。为进一步研究外源性c-di-GMP在体内的作用,研究者将外源性c-di-GMP直接注入鼠乳腺炎感染模型,证实c-di-GMP在体内也能够减弱细菌的毒力及预防感染,这是关于c-di-GMP在体内具有治疗作用的第一次报道^[12]。我们的前期研究结果也发现外源性的c-di-GMP与其它核苷酸类似物相比可以特异性的抑制变形链球菌生物膜的形成,以及体外黏附等^[3],为证实外源性c-di-GMP在动物体内是否同样对变形链球菌具有治疗作用,我们以外源性c-di-GMP、氯化钠水溶液分别给大鼠口腔施药,观察二者对龋病发生、发展的影响。通过唾液取样进行变形链球菌培养计数,结果显示c-di-GMP组变链菌计数与阴性对照组相比,无明显差别,表明外源性c-di-GMP无抑制大鼠口内变形链球菌生长的作用,这与本研究的体外实验结果一致。Keyes 龋齿记分结果显示,c-di-GMP组龋损程度及数量都少于阴性对照组,从龋病的发展程度来看,c-di-GMP组最为缓慢,仅存在釉质和牙本质浅层龋损,有效阻止了龋病进展,表明外源性的c-di-GMP具有抑制龋病发生发展的作用。这可能与外源性的c-di-GMP具有抑制变形链球菌生物膜形成、降低牙菌斑聚集、抑制变形链球菌产酸、耐酸的作用有关^[2-3]。因为外源性的c-di-GMP对变形链球菌的生长率没有明显抑制作用,也就是说它的防龋作用应该不是因为具有杀菌效应,因此它导致龋病降低的另一种解释可能是c-di-GMP影响了变形链球菌生长的一些重要生理过程或者因为生物膜形成的抑制而激发了宿主的防御反应,当然c-di-GMP对宿主造成的直接免疫反应也不能排除。同时在应用c-di-GMP后,大鼠的活动,呼吸,及竖毛都无任何改变,提示c-di-GMP对动物没有造成明显致毒作用。

矿物质是牙本质与牙釉质的主要组成成分。龋病实际是由于牙齿脱矿造成的。研究证实氟化物的摄入可以使脱矿的牙齿再矿化,是因为氟离子进入牙齿以后形成结构更加稳定的氟磷灰石晶体,不易被酸溶解^[13]。氟化物能够防龋的另一个原因就是它可以抑制细菌的代谢。氟在离子状态(F^-)时并不能穿透细菌的细胞壁和细胞膜,但是可被吸收为氟化氢(HF)^[14]。当菌斑中pH下降时,部分氟离子就可以与氢离子结合形成 HF ,渗透入菌细胞内,进入细胞后,酸化、溶解细胞,从而破坏细菌。虽然氟化物防龋是最常用的第一道防线,但是氟化物摄入与龋病之间的反向关系在大量的研究中还未观察到^[15-16]。

细菌特有基因作为病原体在体内生存是保持毒力

关键的因素,为开发传统抗生素(受制于细菌的抗药性)的替代药物提供了新的具有细胞毒潜能的靶点。针对毒力因子应用抗生素制剂是一条有吸引力的途径。针对特异毒力功能或相关基因转录机制的小的治疗分子(如c-di-GMP)跟针对代谢功能应用的现代治疗方法(如:氟化物的应用)相比不会产生同样的单向抗药现象,这对于大部分细菌来说是非常关键的。同时,同传统的抗生素制剂相比,针对基因水平的小治疗分子应用使耐药株的产生和传播都会大大减慢。新型治疗分子抑制细菌毒力,可预防感染的发生,可作治疗之用,或者跟其它的抗生素制剂联合应用对抗严重感染。更重要的是,这些小的新型治疗分子不会产生耐药性。可见c-di-GMP这种环形的二核苷酸是一个新型的且非常有用的抗微生物分子。在本研究中,Keyes 记分研究结果也显示c-di-GMP的抑龋作用效果与氟化钠相当,而作为小的天然分子,其毒副作用较氟化物小,本实验结果为天然分子替代氟化物应用于防龋提供了理论基础,虽然对c-di-GMP的药代动力学和药效学特征还不十分清楚,但是从本研究中可以明确发现该分子能够作用于变形链球菌,当将其直接应用于感染部位时可以减弱致病菌的毒力作用。其确切作用机制有待进一步研究。本实验结果提示,外源性c-di-GMP可以有效抑制龋病的发生和发展,有可能成为一种新型防龋药物。

参考文献:

- [1] Tinanoff N, Brady JM, Gross A. The Effect of NaF and SnF2 mouthrinses on bacterial colonization of tooth enamel [J]. Caries Res, 1976, 10(5): 475.
- [2] 闫文娟, 吴补领, 屈铁军, 等. 外源性c-di-GMP对变形链球菌产酸、耐酸能力的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(9): 510-2.
- [3] Yan W, Qu T, Zhao H, et al. The effect of c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) on the biofilm formation and adherence of *Streptococcus mutans* [J]. Microbiol Res, 2010, 165(2): 87-96.
- [4] Navia JM, Lopez H. Rat caries assay of reference foods and sugar-containing snacks [J]. J Dent Res, 1983, 62(8): 893-8.
- [5] 闫文娟. c-di-GMP信号通路在变形链球菌致龋过程中作用的初步研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [6] 赵红萍. 变形链球菌葡聚糖结合蛋白D基因克隆表达及功能初步研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2006.
- [7] Hao YQ, Zhou XD, Xiao XR et al. Effects of cecropin-XJ on growth and adherence of oral cariogenic bacteria *in vitro* [J]. Chin Med J, 2005, 118(2): 155-60.
- [8] Keyes PH. Dental caries in the molar teeth of rats. II. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously [J]. J Dent Res, 1958, 37(6): 1088-99.
- [9] Jonas K, Melefors O, Romling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms [J]. Future Microbiol, 2009, 4(3): 341-58.
- [10] Schirmer T, Jenal U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signaling [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(10): 724-35.
- [11] Sanchez-Torres V, Hu H, Wood TK. GGDEF proteins YeaI, YedQ, and YfiN reduce early biofilm formation and swimming motility in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(2): 651-8.
- [12] Karaolis DK, Rashid MH, Chythanya R, et al. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (3): 1029-38.
- [13] Brown WE, Gregory TM, Chow LC. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis [J]. Caries Res, 1977, 11(Suppl 1): 118-41.
- [14] Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluorides [J]. Community Dent Oral Epidemiol, 1999, 27 (1): 31-40.
- [15] Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries [J]. Monogr Oral Sci, 2011, 22: 146-57.
- [16] Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry [J]. Braz Oral Res, 2010, 24(Suppl 1): 9-17.

(编辑:吴锦雅)