

• 论 著 •

薄荷复方煎液对致龋菌生长代谢的体外研究*

丘创华¹, 李卓成^{1△}, 孙 墅²

(深圳市第二人民医院:1. 检验科 2. 口腔科, 广东深圳 518000)

摘 要:目的 研究薄荷复方煎液对致龋菌生长及产酸的影响,明确薄荷复方煎液的抗菌机制。方法 选择变形链球菌、血链球菌和牙龈卟啉单胞菌作为实验菌株,用纸片扩散法测定薄荷复方煎液对菌株的抑制作用,同时测量不同质量浓度薄荷复方煎液对菌株产酸的影响。结果 薄荷复方煎液能有效抑制血链球菌和牙龈卟啉单胞菌的生长,同时有效抑制各实验菌株的产酸能力,只是在药物质量浓度上有一定差异。结论 薄荷复方煎液对致龋菌的生长和酸代谢具有一定的抑制作用。

关键词:龋齿/微生物学; 培养基; 薄荷复方煎液; 产酸; 抑制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)02-0155-03

Effect of Menthol compound decoction on the growth and metabolism of cariogenic bacteria in vitro*

Qiu Chuanghua¹, Li Zhuocheng^{1△}, Sun Shu²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Dentistry, Shenzhen Second

People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of menthol compound decoction on the growth and acid metabolism of cariogenic bacteria and to find out the anticariogenic mechanism of Menthol compound decoction. **Methods** Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis and Porphyromonas gingivalis were chosen as the experimental bacteria. Firstly, slip diffusion method was used to examine the inhibitory effect of menthol compound decoction on cariogenic bacteria. Secondly, observing the effect of menthol compound decoction of different concentration on acid metabolism. **Results** Menthol compound decoction could inhibit the growth of Streptococcus sanguinis and Porphyromonas gingivalis. And it also inhibited the acid production of cariogenic bacteria, but the concentration of menthol compound decoction were different. **Conclusion** Menthol compound decoction may have an inhibitory effect on the growth and acid metabolism of cariogenic bacteria.

Key words: dental caries/microbiology; culture media; menthol compound decoction; acid metabolism; inhibitory

现代龋病学认为,龋齿在本质上是口腔菌群生态失衡性疾病。抗菌药物的使用、免疫防龋和氟化物防龋等方法虽具有一定的防龋效果,但仍有诸多局限性。本研究选用一些具调理菌群生长和代谢作用的天然药物包括薄荷、仙灵脾、露蜂房等中药,研究其对致龋菌生长和产酸的影响,为今后筛选能有效调理口腔菌群生态平衡的药物提供参考,从而可以制作出更加对症的、精确的防治药物。

1 材料与方法

1.1 配制薄荷复方煎液 组方:薄荷 15 g,食盐(炒,后下)10 g,川椒 10 g,仙灵脾 10 g,补骨脂 15 g,细辛 5 g,白芷 10 g,石菖蒲 10 g,蚤休 20 g,露蜂房 10 g。加水 1 000 mL,文火煎 3 h 至约 100 mL 过滤、离心 3 次,制成原液。

1.2 选择致病菌 购买美国变形链球菌 ATCC25175、血链球菌 ATCC10556、牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 各 1 支。

1.3 制备药物纸片 选择新华 1 号中性定性滤纸,用打孔器打成直径 6 mm 圆片,将制作好的滤纸分装到小西林瓶里,用牛皮纸封瓶口进行高压(121 ℃、15 min)烘干后分别加入薄荷复方煎液、0.05%氯己定溶液(阳性对照)和 0.9%生理盐水各 1 mL,置于冰箱内过饱和液体浸泡过夜,取出纸片再置于冷冻

真空干燥机内抽干,4 ℃密封保存。

1.4 纸片扩散抑菌法 将变形链球菌、血链球菌、牙龈卟啉单胞菌分别接种于脑心浸液肉汤(BHI)培养基中,在 80%氮气(N₂)、20%二氧化碳(CO₂)、37 ℃条件下厌氧培养 24 h,用 BHI 将菌悬液浓度调至 1.0 McFarland(3×10⁸ CFU/mL)备用。将配制好的变形链球菌、血链球菌、牙龈卟啉单胞菌 100 μL 分别滴入 3 个牛 BHI 固体培养基,用三角形波棒推匀后在琼脂表面放置上述浸药滤纸片,轻轻加压,使其与培养基接触无空隙。每平皿放置各纸片 1 片,每次 4 个平行平皿,80%N₂、20%CO₂、37 ℃下厌氧培养 48 h,用卡尺测量抑菌圈直径,实验共重复 3 次,结果取平均值。

1.5 薄荷复方煎液对口腔致龋细菌产酸水平的影响 将薄荷复方煎液按倍比稀释法制成 0.125、0.250、0.500、1.000 g/mL,消毒后备用。利用 1 mol/L 的 NaOH 将 BHI 液体培养基调定初始 pH 值为 7.4。取消毒试管 5 支,每支试管中加入 BHI 液体培养基(pH 7.4)4 mL,3×10⁸ CFU/mL 变形链球菌的菌悬液 0.2 mL,在 1~4 号试管中分别加入 0.125、0.250、0.500、1.000 g/mL 薄荷复方煎液 0.2 mL,5 号试管中不加药液作为对照组。同理测定薄荷复方煎液对血链球菌、牙龈卟啉

* 基金项目:深圳市科技创新委员会资助项目(JCYJ20130401114747777)。 作者简介:丘创华,男,临床检验诊断学硕士,主要从事临床血液学的研究。 △ 通讯作者, E-mail: lizhuocheng@163.com。

单胞菌产酸水平的影响。

1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析的 Dunnet t 检验, 检验水准: $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 薄荷复方煎液对 3 种致龋细菌的抑菌效果 薄荷复方煎液对血链球菌、牙龈卟啉单胞菌的抑菌圈直径与 0.05% 氯己定组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。对变形链球菌抑菌效果较差, 与 0.05% 氯己定比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 薄荷复方煎液对 3 种致龋细菌的抑菌效果比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)			
项目	变形链球菌	血链球菌	牙龈卟啉单胞菌
薄荷复方煎液	7.15±0.42*	17.51±1.32	15.35±0.85
0.05% 氯己定	15.75±1.25	16.02±0.85	15.87±0.93
生理盐水	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

*: $P<0.05$, 与 0.05% 氯己定比较。

2.2 薄荷复方煎液对 3 种致龋细菌产酸的抑制作用 薄荷复方煎液不同质量浓度对 3 种致龋细菌产酸具有不同程度的抑制作用。血链球菌和牙龈卟啉单胞菌产酸随薄荷复方煎液质量浓度增加而减少, 各质量浓度组与对照组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。0.500、1.000 g/mL 薄荷复方煎液对变形链球菌产酸的抑制作用与对照组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。0.125、0.250 g/mL 薄荷复方煎液对变形链球菌产酸的抑制作用与对照组比较并未发生明显改变, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 薄荷复方煎液对 3 种致龋细菌产酸的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, \text{g/mL}$)			
组别	变形链球菌	血链球菌	牙龈卟啉单胞菌
对照组	1.80±0.03	1.75±0.04	1.82±0.03
薄荷复方煎液 (g/mL)			
0.125	1.66±0.12	1.02±0.15*	1.25±0.13*
0.250	1.58±0.22	0.32±0.11*	0.49±0.07*
0.500	1.12±0.35*	0.29±0.06*	0.46±0.07*
1.000	0.84±0.39*	0.25±0.04*	0.35±0.06*

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

龋病是在以细菌为主的多种因素影响下, 牙体硬组织发生慢性进行性破坏的一种疾病, 其中变形链球菌、粘性放线菌、乳杆菌、血链球菌是最主要的病原菌^[1]。牙周病是一种常见的多发的感染性破坏性口腔疾病, 是发生在牙齿支持组织的疾病包括牙周软、硬组织炎性紊乱与破坏, 牙周病证据最充分的致病菌是伴放线放线杆菌和牙龈卟啉单胞菌。因此本研究选择变形链球菌、血链球菌和牙龈卟啉单胞菌作为研究的细菌。

越来越多的研究表明, 慢性牙周炎的危害已不仅局限于口腔, 还与一些全身系统性疾病密切相关。牙周感染导致的菌血症和脓血症促进了全身免疫反应和炎性反应, 从而影响系统性疾病的发生、发展。牙龈卟啉单胞菌还能通过降解低密度脂蛋

白 (LDL) 中载脂蛋白 (Apo) B-100, 引起低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 升高, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 降低, 导致巨噬细胞吞噬增加, 巨噬细胞吞噬大量胆固醇后转变为泡沫细胞, 进而引起血脂升高, 表明牙周感染可导致血脂异常^[2]。牙周病患者总胆固醇 (TC) 和 LDL 水平升高表明牙周病可能会增加心血管疾病的发生风险^[3]。

牙周病是多细菌感染性疾病, 单一抗生素抗菌谱无法针对全部牙周病的致病菌。因此在牙周病的治疗中单纯采用甲硝唑无法收到理想疗效, 阿莫西林、奥美拉唑与甲硝唑联合使用可有效扩大杀菌范围, 能有效治疗敏感菌感染, 取得较好的临床效果^[4-6]。但单纯应用抗生素对于反复发作容易产生耐药性, 导致菌株和菌群比例失调。中医疗法强调标本兼治, 可补充西医治疗注重局部清洁抗炎、根治效果不明显的缺陷, 在常规治疗基础上结合中医辨证治疗, 疗效显著优于单用西药治疗^[7]。天然药物在龋病防治方面的研究备受关注, 国外研究较多的天然防龋药物有可可、茶多酚、蜂胶等, 国内研究较深入的有厚朴、五倍子、蜂房、茶多酚等。黄正蔚等^[8] 对儿茶、五倍子、蜂房等 11 种中药粗提物的抗菌活性、对细菌代谢产酸和合成胞外多糖能力的影响进行了研究, 结果表明五倍子、蜂房、三七能全面抑制口腔细菌代谢酸的产生, 五倍子、蜂房、血藤、川芎、大黄、儿茶和三七均能显著抑制变形链球菌胞外水不溶性多糖的生成。杨宁等^[9] 研究发现, 中药野黄芩苷具有拮抗脂多糖 (LPS) 抑制人牙周膜细胞增殖的作用。曹寅等^[10] 配制了中药组方——降糖固齿汤, 提取药液, 采用二倍稀释法进行抑制牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌生长实验, 发现中药原液能抑制牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌增长。姜迎春等^[11] 研究发现, 银杏叶提取物对牙龈卟啉单胞菌具有抑菌作用。

薄荷复方煎液配方是本院中医科专家通过多年临床经验总结得出的包括薄荷、川椒、细辛、补骨脂、仙灵脾、白芷、石菖蒲等 10 味中药, 不但有杀菌消炎作用, 而且能通过调节机体免疫力提高牙齿抗病能力, 成本很低廉, 充分利用了我国博大精深的中医理论和丰富的中药资源防治龋病、牙周病。本研究结果表明, 薄荷复方煎液对血链球菌、牙龈卟啉单胞菌有较好的抑菌作用, 其抑菌效果等效于 0.05% 氯己定; 薄荷复方煎液对变形链球菌亦有一定的抑菌作用。

致龋菌通过无氧酵解代谢碳水化合物产生有机酸, 在牙菌斑生物膜中使酸性代谢产物积聚, 导致釉质脱矿, 龋损发生。本研究结果显示, 薄荷复方煎液在各个质量浓度梯度时对血链球菌、牙龈卟啉单胞菌的产酸均有显著抑制作用, 对变形链球菌的产酸抑制作用较弱, 只有 0.500、1.000 g/mL 薄荷复方煎液对变形链球菌的产酸具有显著抑制作用。

本研究结果显示, 薄荷复方煎液对血链球菌、变形链球菌和牙龈卟啉单胞菌均有明显的抑制和杀灭作用, 已达到满意的预期效果。但具体药物作用机制尚有待于进一步研究, 后续通过动物实验和毒理实验及临床试用检验效果, 最终制作出特效的防治龋病、牙周病的漱口水和局部治疗龋病、牙周病的药物。

参考文献

[1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 58.
[2] Lei L, Li H, Yan F, et al. Hyperlipidemia impaired innate immune response to periodontal pathogen porphyromonas(下转第 158 页)

0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

HSV1 DNA 阳性率为 0.5%(7/1 422), HSV2 DNA 阳性率为 1.1%(16/1 422)。HSV IgM 和 IgG 同时阳性者 HSV1 DNA 阳性率为 0.4%(4/1 008), HSV2 DNA 阳性率为 0.6%(6/1 008); 仅 HSV IgG 阳性者 HSV1 DNA 阳性率为 0.7%(2/284), HSV2 DNA 阳性率为 2.1%(6/284); 仅 HSV IgM 阳性者 HSV1 DNA 阳性率为 0.8%(1/130), HSV2 DNA 阳性率为 3.1%(4/130)。3 种情况 HSV 抗体阳性者 HSV1 DNA 阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$), 而 HSV2 DNA 阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 HSV 抗体阳性与 HSV DNA 阳性结果比较[n(%)]

HSV 抗体阳性	n	HSV1 DNA 阳性	HSV2 DNA 阳性
HSV-IgM 和 IgG 同时阳性	1 008	4(0.4)	6(0.6)
仅 HSV-IgG 阳性	284	2(0.7)	6(2.1) *
仅 HSV-IgM 阳性	130	1(0.8)	4(3.1) *

* : $P<0.05$, 与 HSV-IgM 和 IgG 同时阳性比较。

3 讨 论

HSV1 感染一般发生于眼唇、口腔、脑和腰部以上皮肤, HSV2 感染较常见于子宫颈、外生殖器及腰部以下皮肤^[2]。孕妇感染 HSV 可使胎儿产生先天性感染, 诱发流产、早产、死胎、畸形等^[3-4]。因此, 怀孕期间应将 HSV 作为常规检测项目, 对阳性患者早做处理, 即产前诊断很有必要。产前诊断是指在出生前对胚胎或胎儿的发育状态、是否患有疾病等进行检测诊断, 产前诊断是围生期保健的重要组成部分, 是有效提高我国人口素质、减少各种缺陷性疾病发生的重要手段^[5]。

HSV 主要经产道感染胎儿黏膜进而感染胎儿。胎儿及新生儿感染 HSV 后预后较差, 有研究表明, 在原发感染 HSV 胎儿中 40% 出现严重围产期死亡, 而继发感染病例围生期死亡率显著降低^[6]。

孕妇若发生感染大约在 4~7 d 时能检测出 IgM 抗体, 是早期发生感染的指标; IgG 抗体大约在感染 15 d 后才出现^[7-8]。联合 IgM 和 IgG 检测有利于帮助孕妇查明是最近感染、再次感染、还是既往感染; (1) IgG(+), IgM(-) 说明是既往发生的感染, 孕妇具有一定免疫力; (2) IgG(-), IgM(+), 说明是最近发生的感染; (3) IgG(+), IgM(+), 说明是既往感染或再次感染; (4) IgG(-), IgM(-) 说明无免疫力, 能够进行免疫接种。其中(2)项和(3)项均可表明是最近可能发生感染, 确认需要做

进一步实验^[9]。

母体 HSV1 抗体对胎儿的保护效应显著弱于 HSV2 抗体的保护, 妊娠期间激活的 HSV1 抗体传播给胎儿的风险显著高于 HSV2^[10]。由于化学发光法检测的 HSV 抗体不能区分 HSV1 还是 HSV2, 本院采用 PCR 检测患者宫颈分泌物中 HSV DNA, 对 HSV 种类进行鉴别。因采用的标本是宫颈分泌物, 可能对 HSV1 的检测阳性率会偏低一些, 但是 HSV 是作用于神经节, 而且主要经产道感染胎儿, 所以足以达到检测目的。

综上所述, 在临床工作中对 HSV 应早期筛查、早期发现, 及早对孕妇进行治疗很有必要。如孕妇早期或中期检测出 HSV DNA 阳性时最好立即终止妊娠; 而孕妇处于妊娠晚期或不愿终止妊娠时应主动配合检查, 同时结合超声波、羊水穿刺等方式进行动态监测, 及时采取适当措施。

参考文献

[1] 乌兰, 唐红, 王丽. 血清学指标检测在单纯疱疹病毒感染患者中的临床价值探讨[J]. 医学信息, 2014, 27(4): 193.

[2] 张英伟. 单纯疱疹病毒感染临床特点分析[J]. 转化医学电子杂志, 2014, 1(5): 103.

[3] 边静, 陈兆芳. 优生优育五项检测的临床意义探讨[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(32): 22.

[4] 贺元川, 鲁增辉, 赵宗杰, 等. 樟芝提取物体外抗单纯疱疹病毒 II 型的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 2058-2061.

[5] 李红. 孕妇血液学检查在产前诊断中的临床应用分析[J]. 中国实用医药, 2015, 10(2): 106-107.

[6] 孙玲玲, 邓学东, 梁泓, 等. 产前超声在妊娠期多病原体感染胎儿诊断中的应用[J/CD]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2014, 11(7): 41-45.

[7] 顾雷君, 王晔恺, 陈萍. 2010-2013 年舟山地区 TORCH 三项血清检测结果分析[J]. 中国乡村医药, 2014, 21(8): 53-54.

[8] 高文静, 乔杰, 莫顺华, 等. 东莞市城区孕妇 TORCH 感染情况调查分析[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(9): 106-107.

[9] 曾莎, 曹龙滨, 李军. 孕妇血清 TORCH 检查中 IgM 及 IgG 的临床分析[J]. 医学信息, 2014, 27(10): 24.

[10] 林晓萍, 刘建军, 邱惠萍, 等. 疱疹病毒感染与不良妊娠结局相关性的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(4): 319-322.

(收稿日期: 2015-08-17)

(上接第 156 页)

gingivalis in apolipoprotein E knockout mice[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71849.

[3] Sandi RM, Pol KG, Basavaraj P, et al. Association of serum cholesterol, triglyceride, high and low density lipoprotein (HDL and LDL) levels in chronic periodontitis subjects with risk for cardiovascular disease(CVD): A cross sectional study[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(1): 214-216.

[4] 岑乐. 奥美拉唑、阿莫西林合并甲硝唑治疗牙周病的临床分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(21): 193-194.

[5] 彭源. 奥美拉唑、阿莫西林联合甲硝唑治疗牙周病的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(15): 517-518.

[6] 胡建立, 王寅丽. 甲硝唑治疗牙周病的临床观察[J]. 中国药房, 2014, 25(16): 1469-1470.

[7] 刘丽华. 中西医结合治疗牙周病的临床疗效[J]. 中国社区医师, 2015, 31(24): 80-81.

[8] 黄正蔚, 周学东, 肖悦, 等. 11 种天然药物对乳酸杆菌生长与产酸影响的体外研究[J]. 上海口腔医学, 2005, 14(1): 67-70.

[9] 杨宁, 张莹, 葛志华, 等. 野黄芩苷拮抗内毒素抑制人牙周膜细胞增殖作用的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2010, 20(1): 14-17.

[10] 曹寅, 张琪, 徐燕, 等. 降糖固齿汤抑制牙周致病菌实验的研究[J]. 口腔医学, 2012, 32(10): 622-624.

[11] 姜迎春, 李含薇, 李咏梅, 等. 银杏叶提取物对牙龈卟啉单胞菌的体外抑菌作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014, 40(5): 1018-1023.

(收稿日期: 2015-09-02)