论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2314-04

光动力学疗法影响人工菌斑生物膜形成的扫描电镜观察

许小辉[1],林居红[1],刘明方[2] (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科[1];400016 重庆,重庆医科大学实验教学中心[2])

【摘要】 目的 研究甲苯胺蓝介导的光动力学疗法对体外人工菌斑生物膜形成的影响,探讨光动力学疗法控制菌斑和防治龋病的可能机制。方法 体外环境下,4种口腔常见致龋菌在牙釉质表面形成多细菌混合性菌斑生物膜,用光动力学疗法处理实验组菌斑生物膜,光敏剂浓度为0.1 mg/ml、光强为94.5 J/cm^2;分别在生物膜形成的第1、3、7天用扫描电镜观察光动力学疗法处理对生物膜形成的影响。结果 对照组第1天可见到以链球菌为主的细菌黏附于获得性膜上;第3天各种细菌数量明显增多,形成谷穗状结构;至第7天时,生物膜形成复杂的三维立体结构,细菌表面及细菌之间可见大量基质和不定形胶状物。在第1、3、7天,光动力学疗法处理后牙釉质表面黏附的细菌显著减少,菌斑生物膜形成受阻。结论 光动力学疗法对菌斑生物膜的形成有抑制作用。

【关键词】 光动力学疗法;龋病;菌斑生物膜;扫描电镜
【中图法分类号】 R372;R454.2;R781.1 【文献标志码】 A

Effect of photodynamic therapy on biological membrane formation of artificial dental plaques

Xu Xiaohui[1], Lin Juhong[1], Liu Mingfang[2] ([1]Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015; [2]Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of toluidine blue-mediated photodynamic therapy on biological membrane formation of dental plaques and its mechanism for the control of dental plaques and prevention of dental caries. Methods Biological membrane of dental plaques caused by 4 cariogenic oral bacteria was treated with photodynamic therapy. Concentration of the photosensitizer was 0.1 mg/mL and the light intensity was 94.5 J/cm^2. Effect of photodynamic therapy on biological membrane formation of dental plaques was observed under a scan electron microscope in 1, 3 and 7 d after photodynamic therapy. Results In the control group, Streptococci were adhered to the acquired membrane 1 day. The number of different bacteria reached their peak in 3 d, with a grainy spike-like structure. A 3-dimensional structure of biological membrane was found in 7 d with massive matrix and irregular colloid substance. The number of bacteria was significantly decreased and the formation of biological membrane was inhibited in 1, 3 and 7 d after photodynamic therapy. Conclusion Photodynamic therapy can inhibit the formation of biological membrane of dental plaques.

【Key words】 photodynamic therapy; dental caries; biological membrane of dental plaque; scan electron microscope

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-243). Corresponding author: Lin Juhong, Tel: 86-89035821-8301, E-mail: juhonglin@sina.com

作为典型的细菌性生物膜,牙菌斑由链球菌属、乳杆菌属、放线菌属等微生物细胞及其细胞外基质组成[1]。具有致龋特性的细菌构成的牙菌斑能诱发龋病的发生,称特异性致龋牙菌斑。光动力学疗法(photodynamic therapy,PDT)是一种联合利用光、光敏剂和氧分子产生光化学效应选择性杀伤病原微生物的新方法[2]。研究表明光动力学疗法能显著抑制浮游状态下口腔致龋菌的生长和细胞外多糖的产生[3],有望成为防治牙菌斑相关性疾病的一种新方法。在自然状态下,细菌主要以菌斑生物膜的形式在牙表面聚集从而发挥作用。本实验模拟口内环境,使用4种口腔

【基金项目】 重庆市卫生局科研课题(2008-2-243)
【通信作者】 林居红,电话:(023)89035821-8301,E-mail:juhonglin@sina.com

常见细菌在形成获得性膜的牙釉质块表面构建人工菌斑生物膜模型，并用光动力学疗法干预其形成过程，以观察光动力学疗法对菌斑生物膜的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用牙釉质块的准备 选取因正畸拔除的第 1 双尖牙或因阻生拔除的第 3 磨牙，在体视显微镜下观察，排除龋坏、裂痕、缺损和发育异常，超声彻底清洗，截去牙根，将牙冠唇侧部分用金刚石切割片制成大小均一的釉质块 12 块，分别用 600、800、1 500、3 000 目砂纸打磨，无氟抛光粉抛光，除唇面外其余各面均用抗酸指甲油封闭，待指甲油干燥后高压灭菌，将釉质块保存于 0.1% 麝香草酚溶液中，备用[4]。

1.1.2 光敏剂和光源 甲苯胺蓝（toluidine blue O，TBO）粉剂（Sigma，St. Louis，MO，USA），平均相对分子质量 305.82，用去离子水配置成浓度为 0.1 mg/ml 的溶液，0.22 μm 微孔滤器过滤除菌，4 ℃下避光保存，备用。光源：欧美娜窄谱红光光动力治疗仪（Photo Therapeutics Ltd，UK），光源类型为 LED 二极管非相干光，波长（633 ± 3）nm，输出功率（40 ± 5）W，功率密度为 100 mW/cm^2。

1.1.3 试剂和主要仪器 培养基：BHI 培养基，由友康基业生物科技（北京）有限公司提供。主要仪器：离心机 LD5-2A 型（北京医用离心机厂），扫描电子显微镜（JSM5900LV 型），Ultrospec 2100 pro 紫外/可见光分光光度计（GE Healthcare，USA）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验菌株及菌悬液的制备 变形链球菌 Streptococcus mutans ATCC25175；远缘链球菌 Streptococcus sobrinus ATCC 6715；黏性放线菌 Actinomyces viscosus ATCC15978；嗜酸乳杆菌 Lactobacillus acidophilus ATCC 4356。以上实验菌株由四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室提供。将上述 4 种细菌复苏、活化，分别接种于 5 ml BHI 液体培养基中，37 ℃下厌氧（80% N_2，10% H_2，10% CO_2）培养 18 h，涂片检查及生化鉴定为纯培养后，将菌悬液转入离心管，3 000 × g 离心 15 min 收集细菌。弃上清液，菌细胞用无菌蒸馏水洗涤。再次离心，重复离心洗菌 2 次。洗净的菌细胞用 BHI 培养基稀释，分光光度计调整菌液浓度为 D(540) = 1，取等量 4 种细菌菌液充分混合，调整菌液浓度 D(540) = 1 作为混合菌液[5]。

1.2.2 非刺激性唾液的收集 定时（上午 9:00 - 11:00）收集口腔健康状况良好，无龋病和牙周疾患、6 个月内口腔局部或全身未使用过抗生素及漱口水等其他防龋保健品的志愿者的非刺激性混合唾液，4 000 × g 离心 20 min，取上清，0.22 μm 微孔滤器过滤除菌，4 ℃保存备用。

1.2.3 菌斑生物膜制备及实验处理 釉质块用无菌去离子水彻底清洗，置于非刺激性唾液滤过液中，37 ℃下放置 24 h 以形成人工获得性膜。用 PBS 缓冲液（pH 7.0）轻轻冲洗形成获得性膜的釉质块，然后转入 5 ml BHI 液体培养基中，并按 10:1（体积分数）接种混合菌液 500 μl，37 ℃兼性厌氧条件下（80% N_2，10% H_2，10% CO_2）培养，每隔 12 h 换 5 ml 新鲜培养基。12 个釉质块随机平均分成两组，每组 6 个平行。对照组换液后继续培养，实验组分别在 12 h 换液和隔天换液时将釉质块取出，唇面滴加 25 μl 甲苯胺蓝，黑暗中放置 5 min 后用 LED 光源照射 15 min，相应的能量密度为 94.5 J/cm^2。无菌 PBS 缓冲液轻轻冲洗后放回新鲜培养基中，培养条件如前，每次换液前后均涂片及培养检查以确保样本无污染。

1.2.4 扫描电镜样本观察 在菌斑生物膜形成的第 1、3、7 天分别取出实验组及对照组釉质块，用无菌 PBS 缓冲液轻柔漂洗 2 遍以去除疏松附着的游离菌，立即放入 3% 戊二醛溶液中，4 ℃过夜，然后依次用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水，干燥、喷金，扫描电镜观察。

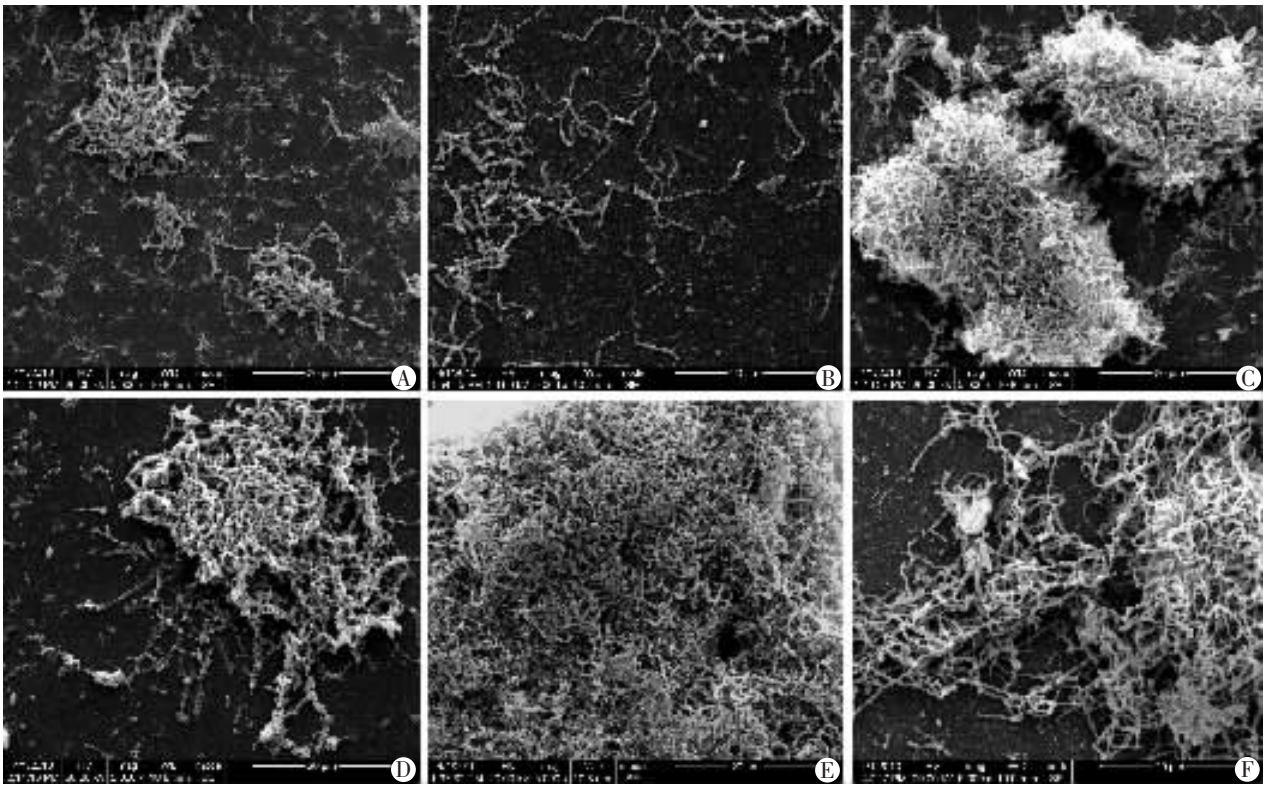
2 结果

对照组第 1 天可见到以链球菌为主的细菌黏附于获得性膜上，细菌之间有聚集成团的趋势（图 1A）。菌斑生物膜形成的第 3 天细菌量明显增多，可看到杆菌和放线菌被链球菌包裹缠绕，形成谷穗状结构，细菌之间存在较多不定形胶状物（图 1C）。至第 7 天时，细菌数量与堆积厚度进一步增加，生物膜形成更为复杂的三维立体结构，细菌表面及细菌之间可见大量基质，将细菌连接成大片菌斑（图 1E）。在第 1、3、7 天，实验组菌斑生物膜的厚度均明显小于对照组，细菌之间的黏附也相对疏松，较少见到基质和不定形胶状物（图 1B、D、F）。

3 讨论

光动力学疗法是 20 世纪 70 年代末出现的一种无创或微创性、非产热性的、利用光化学反应杀伤病原微生物的治疗方法。主要涉及光敏剂、光源和氧分子[6]，其原理是光敏剂进入机体后能特异性聚集于病变组织中，在适当波长的光照射下，光敏剂从稳定的基态跃迁至不稳定的激发态，并把能量传递给氧分子，接受了能量的氧分子发生一系列复杂的光化学反应，产生具有强氧化性的多种活性氧物质（单线态氧等）。活性氧物质与靶细胞发生复杂的化学反应，最终杀死靶细胞，达到治疗目的。近年来，光动力学疗法逐渐应用于抗菌领域。与传统抗菌疗法相比，光动力疗法不仅对各种革兰阳性菌和阴性菌都有显著的抑制作用，而且不会产生细菌耐药性、对正常组织细胞影响较小，非常有潜力成为传统抗菌的辅助疗法或替代疗法。目前光动力学疗法在口腔疾病领域的应用还处于起步阶段。

牙菌斑生物膜是各种细菌在口腔中存在的主要生态形式，也是龋病发生、发展的始动因子和主要因素[7]。与浮游状态的细菌相比，生物膜内的细菌生理状态发生显著变化，比浮游状态下的同种细菌具有更强的耐药性、毒力，对抗宿免疫防御的能力也大大增强。目前去除菌斑的主要方法是机械去除和抗菌药物



A:对照组第1天;B:实验组第1天;C:对照组第3天;D:实验组第3天;E:对照组第7天;F:实验组第7天

图1 扫描电镜观察2组不同时间菌斑生物膜的形成 (×5 000)

的使用,机械去除法很难长期维持菌斑控制的理想水平,对于一些隐蔽的牙面,如较深的窝沟、邻面,常常无法达到满意的效果。抗菌药物的长期使用会导致细菌耐药性和菌群失调的产生。光动力学疗法不仅对致龋菌有抑制作用,而且利用注射器很容易将光敏剂涂布于牙面或龋损部位,然后合适光源通过光纤递送,操作方便。基于以上优点,光动力学疗法在控制菌斑和龋病预防领域有很广泛的应用前景。光动力学疗法的成功率依赖于适宜的光敏剂和光源,其生物效应由受照射靶细胞和靶组织中的光敏剂浓度、照射光量以及分子氧含量等多种因素决定[8]。甲苯胺蓝是一种细胞核染色剂,广泛应用于组织细胞学及病原生物学领域。近年来发现甲苯胺蓝可以被波长为630 nm左右的红光激发产生光化学效应。国内外大量的研究表明,甲苯胺蓝作为光敏剂,当其浓度在0.1 mg/ml时对包括变形链球菌内的多种口腔致病菌有杀伤作用[9],并且对正常组织无明显毒副作用[10]。因此,我们选择甲苯胺蓝作为光敏剂,而实验中光剂量等参数的筛选则通过前期大量预实验得来。

本研究选择变形链球菌、远缘链球菌、嗜酸乳杆菌和黏性放线菌4种与龋病发生关系密切的菌株在牙釉质块上模拟口腔环境建立体外菌斑生物膜模型,探讨光动力学疗法对致龋菌在釉质面上的黏附和菌斑形成的影响。实验在扫描电镜下观察了光动力学疗法处理组和对照组的牙面获得性膜上的菌斑生物膜形成情况,结果两组在形态上的表现有显著差异。虽然隔天对釉质块进行低浓度甲苯胺蓝和低剂量光处理,但是电镜观察显示,从第1~7天,实验组所形成的菌斑均明显较对照组疏松,较少见到细菌胞外基质和不定形胶状物,没有显著的菌斑堆积表现,细菌的黏附量也较对照组明显降低。实验表明光动力学疗法对细菌在釉质块获得性膜表面的黏附聚集和菌斑生物膜形成有一定的抑制作用。这种效果的取得可能与光动力学疗法抑制细菌生长和破坏菌体结构的作用机制有关。光动力学疗法的抗菌机制与其抗癌作用原理相似,主要依赖于激发态光敏剂和单线态氧对微生物体内蛋白质、核酸、脂类等重要生物大分子以及各种亚细胞器损伤,引起微生物的坏死和凋亡[11]。Sahu等[12]通过原子力学显微镜观察光动力学疗法对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌形态,发现实验组细菌结构发生改变,菌体表面粗糙,形成水泡状结构,提示光动力疗法可以破坏细菌细胞壁和细胞膜并导致菌体内物质流失。我们前期研究也发现,在适宜的光敏剂浓度和光剂量下,光动力学疗法可以降低变形链球菌和黏性放线菌的黏附率,但其具体机制尚有待进一步研究。

参考文献：

[1] Marsh P D. Dental plaque as a microbial biofilm[J]. Caries Res, 2004, 38(3): 204-211.

[2] 夏新蜀，余和平，白定群，等. 新型光动力治疗药物的研究概况[J]. 激光杂志，2007，28(5)：85-86.

[3] Lima J P, Sampaio-de-Melo M A, Borges F M, *et al*. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries[J]. Eur J Oral Sci, 2009, 117(5): 568-574.

[4] Amaechi B T, Higham S M, Edgar W M. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(8): 619-628.

[5] 周智，陈惠珍，胡德渝. 壳寡聚糖对菌斑生物膜形成的影响[J]. 现代预防医学，2007，34(5)：978-980.

[6] Donnelly R F, McCarron P A, Tunney M M. Antifungal photodynamic therapy[J]. Microbiol Res, 2008, 163(1): 1-12.

[7] 彭志庆，林居红，刘明方，等. 国产水溶性蜂胶对主要致龋链球菌及其耐氟菌株致龋性的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(8)：798-801.

[8] 杨镇洲，张云嵩，李梦侠，等. 血卟啉衍生物介导的光动力疗法对人肺腺癌细胞杀伤效应的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：494-496.

[9] Araujo P V, Teixeira K I, Lanza L D, *et al*. *In vitro* lethal photosensitization of S. mutans using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers[J]. Acta Odontol Latinoam, 2009, 22(2): 93-97.

[10] Lin J, Bi L J, Zhang Z G, *et al*. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infections in rats[J]. Lasers Med Sci, 2010, 25(2): 233-238.

[11] Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy[J]. Clin Dermatol, 2006, 24(1): 16-25.

[12] Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, *et al*. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*[J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 96(1): 9-16.

（收稿：2010-06-24 修回：2010-08-11）

（编辑 龙 亮）

文章编号：1000-5404(2010)21-2317-01

个案与短篇

多巴反应性肌张力障碍 1 例

陈晓燕[1]，李 啸[2]（400037 重庆，第三军医大学新桥医院神经内科[1]；402316 重庆，重庆市九龙坡区中西医结合医院内科[2]）

【关键词】 多巴反应性肌张力障碍；治疗

【中图法分类号】 R746 **【文献标志码】** B

多巴反应性肌张力障碍(dopa-resposive dysto-nia，DRD)是一种少见的遗传性慢性运动障碍性疾病[1]，对左旋多巴治疗反应明显。早期诊治，可使患者保持完全正常的生活质量。现将新桥医院 2009 年 5 月收治的 1 例报告如下。

1 临床资料

患者，女性，28 岁，因“进行性四肢僵硬、抖动 23 年”入院。患者 23 年前(5 岁时)无明显诱因出现双下肢活动不灵，行走易绊倒，左侧重于右侧，症状逐渐进行性加重。8 岁时前双下肢明显僵硬，行走时双足尖着地，身体前倾，症状上午轻，傍晚最重，夜间睡眠后又减轻。10 岁时双上肢亦出现僵硬、不灵活，曾在当地就诊，考虑“先天性肌强直症”，具体治疗不详，之后未再就诊。患者四肢僵硬症状进行性加重，站、坐、走均向后倾倒，持物时双上肢大幅度抖动，伴言语含混。18 岁时发展至生活完全不能自理。之后病情相对稳定，未再进展。病程中无复视，无肌肉萎缩、肌肉跳动、肌肉疼痛；无肢体麻木、大小便障碍、饮水呛咳、吞咽困难、强哭强笑、精神行为异常等。于 2009 年 5 月就诊我院。患者足月顺产，自幼发育与正常同龄儿相比无异常。无头部外伤、脑炎及特殊服药史。无特殊家族史。入院查体：生命体征正常，意识清楚，构音障碍，面肌不自主抽动，全身强直，四肢肌张力铅管样增高，双足内翻畸形，共济运动无法配合完成，深浅感觉、深浅反射正常，病理征阴性。入院后查脑电图：轻度异常。TCD 未见异常。胸片、腹部超声未见异常。心电图正常。角膜 K-F 环阴性。头颅 MRI 平扫未见异常。头颅 CT 未见异常。肌电图：运动单位减少，多项波稍增多。体感诱发电位、运动诱发电位均正常。血常规、肝肾功、血脂、风湿系列、血沉、电解质、血清铜蓝蛋白均正常。心肌酶谱：CPK 203 IU/L，余值正常。结合患者病史及辅助检查考虑多巴反应性肌张力障碍，给予卡左双多巴控释片(每片含左旋多巴 200 mg + 卡比多巴 20 mg)1 片，2 次/d、安坦片 2 mg，2 次/d 治疗，4 d 后安坦调整为 2 mg，3 次/d。10 d 后患者四肢僵硬症状有所减轻，能缓慢自行进餐，20 d 后在家属搀扶下能行走。继续维持安坦片 2 mg，3 次/d，卡左双多巴控释片 1 片，2 次/d 治疗，2 个月后患者门诊随访时已能独立行走，但呈前冲步态，安坦片减量为 2 mg，2 次/d，卡左双多巴控释片仍 1 片，2 次/d 治疗，4 个月后复诊查体四肢肌张力轻度增高，行走时躯干稍前倾，双足内斜，余无异常。安坦片减量为 2 mg，1 次/d，维持卡左双多巴控释片 1 片，2 次/d 治疗至今，症状稳定。患者于半年前(2009 年 12 月)再次复诊，生活完全不受限。

（下转 2332 页）

【通信作者】 陈晓燕，电话：(023)68774448，E-mail：cq1997@163.com