文章编号:1000-5404(2012)15-1523-04

论著

光动力学疗法影响变形链球菌生长和形态的体外研究

许小辉[1],蒋 琳[1],林居红[1],刘明方[2] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病中心与口腔预防科[1];400016 重庆,重庆医科大学实验教学中心[2])

[摘要] **目的** 研究甲苯胺蓝为光敏剂介导的光动力学疗法对变形链球菌体外生长及表面形态的影响,探讨光动力学疗法影响致龋菌生长代谢的作用机制。**方法** 在不同光剂量和不同光敏剂浓度下,通过体外活菌菌落计数法测定光动力学疗法对变形链球菌的生长抑制作用,扫描电镜观察光动力学疗法处理前后菌体表面形态的改变,实验分空白对照组、光敏剂对照组、光对照组和实验组,各组间活菌菌落取对数值后采用析因设计方差分析。**结果** 光动力学疗法能显著抑制变形链球菌的体外生长,随着光照时间和光敏剂浓度的增加,其灭菌效果逐渐增强。当光敏剂浓度为100 μg/ml,光照时间为5、15、25 min时,细菌菌落对数值分别为(7.40±0.13)、(6.86±0.14)、(6.44±0.28),与空白对照组(8.30±0.04)相比差异有显著性($P<0.05$),5 min与15 min两实验组之间差异有显著性($P<0.01$)。光敏剂浓度和光剂量二因素之间存在交互作用($F=19.47$, $P<0.01$)。扫描电镜观察显示实验组变形链球菌与对照组相比菌体表面粗糙不平,有水泡状凸起。**结论** 甲苯胺蓝为光敏剂介导的光动力学疗法能显著抑制变形链球菌体外生长并改变其表面形态。

[关键词] 光动力学疗法;变形链球菌;龋病
[中图法分类号] R372; R378.12; R454.2 [文献标志码] A

Photodynamic therapy on viability and morphology of *Streptococcus mutans in vitro*

Xu Xiaohui[1], Jiang Lin[1], Lin Juhong[1], Liu Mingfang[2] ([1]Children's Dental Center and Preventive Dentistry, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147; [2]Center of Laboratory Teaching, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the impact of photodynamic therapy on the viability and morphology of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Methods** Inhibitory action of toluidine blue O-mediated photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* were analyzed by colony-counting method under different light intensity *in vitro*. Cell morphologic changes of *Streptococcus mutans* was observed under scanning electron microscope. Samples were prepared and divided into control group, photosensitizer control group, light control group and photodynamic therapy group. **Results** Photodynamic therapy resulted in a significant reduction in the bacterial growth in a irradiation time- and photosensitizer concentration-dependent manner. When the photosensitizer concentration was 100 μg/ml, irradiation time of 5, 15 and 25 min had colony log value of *Streptococcus mutans* for 7.40±0.13, 6.86±0.14, and 6.44±0.28 respectively, which were significant lower than control group (8.30±0.04, $P<0.05$). Interaction was found between photosensitizer concentration and the light dosage ($F=19.47$, $P<0.01$). Scanning electron microscopy displayed that the bacterial cell surfaces of photodynamic therapy group became rough, with blister shaped bulge. **Conclusion** Photodynamic therapy with toluidine blue O as photosensitizer exerts efficient inhibitory effect on the growth and morphology of *Streptococcus mutans*.

[**Key words**] photodynamic therapy; *Streptococcus mutans*; dental caries

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2008-2-243). Corresponding author: Lin Juhong, Tel: 86-23-88860090, E-mail: juhonglin@sina.com

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[1],当感染部位局限时,其治疗效果更具优势。近年来,PDT逐渐应用于口腔医学。作为继癌症、心血管疾病之后的第3大慢性非传染性疾病,龋病形成和发展的主要因素是细菌及其

[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)88860090,E-mail: juhonglin@sina.com

代谢产物。目前国外已有学者研究不同光敏剂介导的PDT对主要致龋菌的影响,以探索其应用于控制菌斑和预防龋病的可能性[2];国内关于PDT在龋病防治领域的研究报道甚少。变形链球菌是公认的主要致龋菌之一,其在口腔中存在的数量及比例,可以作为龋患风险评估的一个重要指标。本研究通过体外实验观察在不同光剂量和不同光敏剂浓度下PDT对变形链球菌的生长抑制作用,并用扫描电镜观察处理前后变形链球菌菌体形态的改变,初步探讨PDT影响致龋细菌生长代谢的机制,为其作为一种预防龋病的新方法应用于临床提供初步理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与培养基

变形链球菌(*Streptococcus mutans*, ATCC25175)。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。培养基:BHI培养基,由友康基业生物科技(北京)有限公司提供。

1.2 光敏剂和光源

光敏剂:甲苯胺蓝(toluidine blue O,TB)粉剂(Sigma, St. Louis, MO,USA),用生理盐水分别配制成浓度为50、100、200 μg/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),由重庆医科大学附属第一医院提供。具体参数如下:波长(633 ± 3) nm,输出功率(40 ± 5) W,功率密度为100 mW/cm^2,光源类型为LED二极管非相干光。

1.3 实验方法

1.3.1 实验菌液的制备 将变形链球菌ATCC25175冻干菌种复苏,接种于BHI血琼脂培养基,37 ℃下厌氧(80% N_2,10% H_2,10% CO_2)培养48 h,经生化鉴定及形态学检查为纯培养物后,接种于BHI液体培养基增菌18 h,麦氏比浊法调整菌液浓度为1.0McFarland(3.0×10^8 CFU/ml),稀释100倍后备用。

1.3.2 PDT的处理过程和实验分组 取标准96孔板(Coming Incorporated)1个,每孔分别滴加100 μl甲苯胺蓝溶液和100 μl菌液,使甲苯胺蓝最终浓度为25、50、100 μg/ml,菌液浓度为1.5×10^6 CFU/ml。空白对照组分别滴加100 μl BHI培养基和100 μl菌液。在涡旋振荡器上混匀后,黑暗中放置5 min,然后按产品说明书用LED光源在距离96板3 cm处照射,照射时间分别为5、15、25 min,相应的照射剂量为31.5、94.5、157.5 J/cm^2。为了避免光照时间的相互干扰,在处理组照射时,其他各组均用锡箔纸遮盖以隔绝光源。

1.3.3 菌落计数 PDT处理后,将96孔板置于涡旋振荡器上振荡1 min以充分混匀菌液,取100 μl菌液稀释于900 μl 0.01 mol/L无菌PBS缓冲液(pH = 7.0)中,吹打均匀后再取100 μl菌液稀释于900 μl PBS缓冲液中,如此反复做10倍递增连续稀释,使各管中的菌液稀释度分别为10^2 ~ 10^5 CFU/ml,取10^3 ~ 10^5 CFU/ml稀释液各20 μl滴注于BHI琼脂平板培养基上,37 ℃下厌氧(80% N_2、10% H_2、10% CO_2)培养24 ~ 48 h,选择最合适的浓度段进行菌落计数。取每组3个平行样,取均值,实验重复3次。

1.3.4 扫描电镜观察 在无菌试管中放入大小为0.8 cm × 0.8 cm无菌盖玻片,加入5 ml BHI液体培养基,接种菌液100 μl,37 ℃兼性厌氧条件下(80% N_2,10% H_2,10% CO_2)培养24 h后,涂片检查以确保样本无污染。小心弃去菌液,取出盖玻片,无菌PBS缓冲液轻柔漂洗2遍以去除疏松附着的游离菌,实验组盖玻片表面滴加25 μl浓度为100 μg/ml的甲苯胺蓝,黑暗中放置5 min后光照15 min,相应的能量密度为94.5 J/cm^2。对照组盖玻片不做处理,仅用无菌PBS缓冲液轻柔漂洗2遍,将实验组和对照组盖玻片立即放入2.5%戊二醛溶液中,4 ℃下过夜,然后依次用30%、50%、70%、90%、100%乙醇梯度脱水,干燥、喷金,扫描电镜下观察细菌形态。

1.4 统计学分析

用SAS 9.0对实验结果进行处理,各组间进行析因设计方差分析。

2 结果

2.1 光动力学疗法对变形链球菌体外生长的抑制作用

PDT对变形链球菌的生长抑制作用实验结果见表1。单独的光和甲苯胺蓝对变形链球菌生长无明显影响,与空白对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。二者同时作用产生的光动力学效应显著抑制变形链球菌的生长。PDT实验组与空白对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。随着光照时间和光敏剂浓度的增加,其灭菌效果逐渐增强。当光敏剂浓度≤50 μg/ml时,同一浓度段不同光照时间段各组间无显著性差异($P>0.05$)。当光敏剂浓度为100 μg/ml时,光照时间5 min与15 min两实验组间有显著性差异($F=7.91$, $P<0.01$),15 min与25 min两实验组间无显著性差异($F=2.67$, $P>0.05$);光敏剂浓度和光照时间二因素之间存在交互作用($F=19.47$, $P<0.01$)。

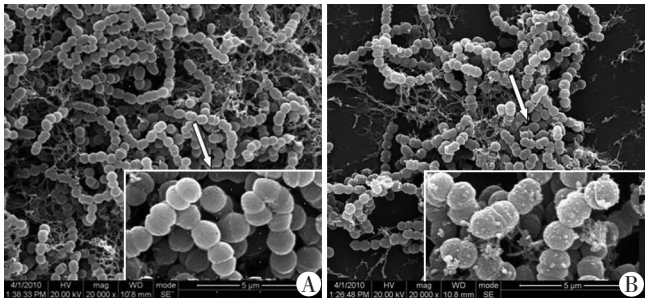
表1 不同浓度甲苯胺蓝和不同光照时间下光动力作用前后Sm菌落数对数值($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

TB浓度	光照时间(min)			
(μg/ml)	0	5	15	25
0	8.30 ± 0.04	8.23 ± 0.05	8.26 ± 0.04	8.24 ± 0.09
5	8.27 ± 0.01	8.00 ± 0.06	7.90 ± 0.08	7.83 ± 0.06[a]
50	8.22 ± 0.04	7.65 ± 0.19[a]	7.57 ± 0.18[a]	7.48 ± 0.21[a]
100	8.21 ± 0.06	7.40 ± 0.13[a]	6.86 ± 0.14[ab]	6.44 ± 0.28[a]

a:$P<0.05$,与0 μg/ml TB比较;b:$P<0.01$,与光照时间5 min比较

2.2 光动力学疗法对变形链球菌形态的影响

扫描电镜图片结果显示:实验组变形链球菌形态与对照组相比有明显变化。在20 000倍扫描电镜图下,对照组变形链球菌菌体外形清晰,菌细胞表面光滑连续、无缺损(图1A),实验组细菌虽然菌体外形清晰,但大部分菌细胞表面粗糙不平,有水泡状凸起,菌细胞周围有散在的不定形物质溢出(图1B)。



A:对照组;B:实验组;右下角为箭头对应处细菌放大图像

图1 扫描电镜观察各组变形链球菌形态 (×20 000)

3 讨论

PDT的主要原理涉及光敏剂、光源和氧分子[3]。光敏剂在适宜光的激发下由基态变成激发态并与周围的氧分子结合,释放出单线态氧等多种活性氧物质。这些活性氧物质可以与微生物体内的重要生物大分子如蛋白质、核酸和脂质发生氧化还原反应,造成生物大分子活性物质丧失,导致微生物死亡[4-5]。与传统抗菌疗法相比,PDT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[6-7]。与单纯的激光治疗相比,PDT属于冷光治疗,更为安全可靠。此外,光敏剂与细菌结合的能力远远强于与哺乳动物体内细胞的结合能力,因此PDT表现出对组织表面或组织内细菌的选择性杀伤作用,而对正常组织细胞影响较小[8];当感染部位局限时治疗效果更具优势。而口腔疾病大多数是由于细菌引起的慢性局限性感染,PDT由于其治疗优势,在口腔医学领域的应用前景被国内外学者看好。国外已有学者[9]证实波长为632.8 nm的He-Ne激光与甲苯胺蓝结合产生的光动力学效应能够破坏变形链球菌生物膜的稳定性,提出甲苯胺蓝和He-Ne激光结合产生的光动力学效应可以用于治疗牙菌斑感染性疾病。然而国内类似研究却鲜有报道。

细菌是影响龋病形成和发展的主要因素,它们以菌斑生物膜的形式在牙表面聚集,通过生长代谢活动,改变局部微环境条件,造成牙体硬组织损伤。变形链球菌血清型c、e、f仍然是公认的与龋病密切相关的主要致病菌,其在口腔中存在的数量以及与其他细菌的比例,可以作为龋患风险评估的一个重要指标[10]。因此本实验选取变形链球菌为研究对象。

Zanin等[11]用甲苯胺蓝与发光2级管激发光(波长为630 nm)结合作用于远缘链球菌和变形链球菌3~7 d的生物膜,发现当甲苯胺蓝浓度为0.1 mg/ml,激发光能量密度为85.7 J/cm^{2}时,产生的光敏作用能够减少生物膜内95%以上的细菌数量。本实验结果显示:甲苯胺蓝为光敏剂介导的PDT可以显著抑制变形链球菌的生长,随着光照剂量和甲苯胺蓝浓度的增加其灭菌效果逐渐增强;当光敏剂浓度为100 μg/ml,光照时间为15 min时,PDT的效果达到最优状态。这个结果与Zanin的结论非常接近,而Araujo等[12]用甲基蓝作为光敏剂观察其被红色激光激发后产生的光动力效应对变形链球菌的影响,在光敏剂浓度为25 mg/L时取得了最佳的抗菌作用(灭菌率为75%);Metcalf等[13]用波长550 nm白色激光激发光敏剂赤藓红作用于变形链球菌,发现5×1 min的间断照射效果优于5 min连续光照,推测原因是连续光照时光敏剂可能还未完全与细菌结合时便被光活化。本实验结果与国外相似实验的差异性说明PDT的成功疗效依赖于适宜的光敏剂类型、剂量和照射光源类型、光剂量等具体治疗参数的精确优化。此外,本实验同时发现,即使增加光照时间至25 min,其灭菌效果与15 min实验组相比并无显著性差异。这表明光敏剂浓度和光照时间二因素之间的交互作用并不单纯是简单的线性关系,二者的具体剂量关联性有待于进一步深入研究。

本实验选择的光敏剂甲苯胺蓝是第2代光敏剂,与第1代光敏剂相比,能迅速与细菌结合并穿透细胞膜进入菌细胞内部,对病变区域、细菌有较好的选择性[14];在组织中有较好的穿透深度;与波长为630 nm左右的光结合能产生单态氧,在杀灭致病菌的同时对正常组织细胞无明显毒副作用[15];本课题组前期研究证明甲苯胺蓝介导的光动力学疗法能显著抑制牙釉质表面人工菌斑生物膜的形成[16];Soukos等[17]报道甲苯胺蓝吸收适宜波长的红色激光后多种细菌的生长,即使当致敏底物,如脱矿牙本质、胶原酶存在的情况下,仍然具有抗菌作用,并且产生光敏作用的过程中对人角化上皮细胞和成纤维细胞不会产生毒性作用。此外,其价格较低,便于推广普及。

本实验扫描电镜图片结果显示:实验组变形链球菌形态与对照组相比有明显变化。对照组变形链球菌菌体外形清晰,菌细胞表面光滑连续、无缺损;实验组变形链球菌虽然菌体外形清晰,但大部分菌细胞表面粗糙不平,有水泡状凸起,菌细胞周围有散在的不定形物质溢出,说明细胞壁和细胞膜接触结构被破坏,由于胞内物质的丧失而导致细菌包膜和体积的减少。

参考文献:

[1] Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy[J].

Clin Dermatol, 2006, 24(1): 16 – 25.
[2] Pagonis T C, Chen J, Fontana C R, *et al*. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy[J]. J Endod, 2010, 36(2): 322 – 328.
[3] Verma S, Watt G M, Mai Z, *et al*. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects[J]. Photochem Photobiol, 2007, 83(5): 996 – 1005.
[4] Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry[J]. J Dent Res, 2007, 86(8): 694 – 707.
[5] Romanos G E, Brink B. Photodynamic therapy in periodontal therapy: microbiological observations from a private practice[J]. Gen Dent, 2010, 58(2): e68 – e73.
[6] Maisch T, Wagner J, Papastamou V, *et al*. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro[J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(5): 1569 – 1578.
[7] Biel M A. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections[J]. Methods Mol Biol, 2010, 635: 175 – 194.
[8] 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.
[9] Zanin I C, Goncalves R B, Junior A B, *et al*. Susceptibility of Streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(2): 324 – 330.
[10] 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.
[11] Zanin I C, Lobo M M, Rodrigues L K, *et al*. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode[J]. Eur J Oral Sci, 2006, 114(1): 64 – 69.
[12] 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.
[13] Metcalf D, Robinson C, Devine D, *et al*. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of Streptococcus mutans biofilms by light fractionation[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(1): 190 – 192.
[14] 栾秀玲, 秦艳利, 白雪峰, 等. 甲苯胺蓝为光敏剂的光动力疗法对龈上菌斑灭菌效果的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2008, 18(2): 94 – 97.
[15] Soares B M, da-Silva D L, Sousa G R, *et al*. *In vitro* photodynamic inactivation of Candida spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 94(1): 65 – 70.
[16] 许小辉, 林居红, 刘明方. 光动力学疗法影响人工菌斑生物膜形成的扫描电镜观察[J] 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2314 – 2317.
[17] Soukos N S, Wilson M, Burns T, *et al*. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated *in vitro*[J]. Lasers Surg Med, 1996, 18(3): 253 – 259.

(**收稿**:2011-12-27;**修回**:2012-03-01)
(编辑 吴培红)

(上接1513页)

班抗凝治疗。密切观察病情变化。血小板逐渐恢复。至4月11日查血小板193.00×10^9/L,患者意识、肢体功能好转。患者家属要求转回当地医院进行康复治疗,于2012年4月12日转院。

2 讨论

本例患者下肢深静脉血栓形成、肺栓塞诊断明确,滤器置入、肺动脉置管溶栓效果满意。应用肝素抗凝12 d后病情突然恶化,有明确的新发血栓,血栓涉及动脉、静脉多处,血小板计数降至28.00×10^9/L,下降了71%,可以排除其他引起血小板下降的原因,而且停用肝素钠后血小板逐渐恢复,血小板减少与肝素钠的应用存在密切的时间相关性。根据Warkentin's评分系统评价[1-2]为肝素诱导性血小板减少症(heparin-induced thrombocytopenia,HIT)发生的高度可能[3]。HIT是一种少见的自身免疫性疾病,由于免疫系统对肝素-血小板因子4(PF4)复合物的识别,损伤了血小板及内皮细胞,引起血小板凝集、形成血栓素,增强凝血反应,以血小板减少及血栓形成为主要表现[3]。目前临床上主要参考Warkentin's评分系统评价患者发生HIT的可能性[1,3]。HIT分为2型[4]。HIT-Ⅰ型为无症状的一过性的血小板减少,常于肝素治疗5 d内发生,血小板计数轻度减少,且无论停用肝素与否都能迅速恢复正常;HIT-Ⅱ型是肝素治疗所致的一种严重的免疫介导的并发症,常导致严重的血栓性疾病,临床意义较大,本例患者所发生的HIT属于此类型。肝素在临床上应用越来越广泛。从围手术期预防深静脉血栓形成到血管手术的肝素化,从动静脉置管护理到心脑血管疾病的抗凝治疗,肝素的应用涉及临床的每个科室。其在解决临床问题的同时也带来了许多不良反应,HIT是较为少见但比较凶险的并发症,而且没有被临床医务人员所认识。国内有关HIT文献报道很少,且多局限于综述。临床医师和护士要不断探索和积累经验,争取做到早发现、早处理各种不良反应,让肝素最大限度为临床服务,并将其危害规避到最低程度。

参考文献:

[1] Warkentin T E, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy[J]. Chest, 2004, 126(3 Suppl): 311S – 337S.
[2] Lo G K, Juhl D, Warkentin T E, *et al*. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(4): 759 – 765.
[3] 章岱, 王雷. 肝素诱导的血小板减少症研究进展[J]. 心血管病学进展, 2010, 31(5): 681 – 684.
[4] 乔雪峰. 肝素诱导血小板减少症发病机制[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010, 13(4): 645 – 646.

(**收稿**:2012-05-28;**修回**:2012-06-11)
(编辑 龙 亮)