论 著

不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌信号分子AI-2活性检测

陈　岚[1,3]，韩林秀[2]，吴　菊[1,3]，徐　皑[4]，刘兴容[1]
1.西南医科大学附属口腔医院 儿童口腔科(泸州 646000)；2.重庆市开州区人民医院 口腔科(开州 405400)；
3.西南医科大学 口颌面修复重建和再生实验室(泸州 646000)；4.西南医科大学附属口腔医院 牙体牙髓科(泸州 646000)

【摘　要】目的 探索不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌(streptococcus mutans，S.mutans)临床分离株的群体感应信号分子AI-2(autoinducer-2，AI-2)的表达差异。 **方法** 以不同龋敏感性儿童口腔分离得到的变异链球菌株(高龋株、中龋株、无龋株)为实验对象，以哈维弧菌BB170(vibrio harveyi BB170)检测各组菌株AI-2的产量，通过实时荧光定量核酸检测系统(real-time quantitative PCR detecting system，RT-qPCR)测定高龋株在不同生长时期*LuxS*与*pfs*基因的表达量情况，分析AI-2的合成与*LuxS*、*pfs*基因的关系。 **结果** 各组菌株均能产生AI-2，其中以高龋株产量最多；高龋株在生长的不同时期均有AI-2的表达，在迟缓期、对数前期表达量较少，到对数后期达到峰值(19.00 ± 0.90，$P < 0.05$)，为阴性对照的19倍，至稳定期开始下降。RT-qPCR结果显示，高龋株在对数后期*LuxS*、*pfs*基因的表达量最高，分别为10.47 ± 0.35、7.22 ± 0.06；*LuxS*、*pfs*基因的转录水平与AI-2的产生保持一致，但AI-2的产生与*LuxS*的相关性更高($P < 0.05$)。 **结论** 致龋敏感性越高的儿童口腔变异链球菌临床分离株产生的信号分子AI-2越多；且AI-2活性与*LuxS*基因转录水平相关性较*pfs*基因转录水平相关性高。

【关键词】变异链球菌；群体感应；AI-2；*LuxS*；*pfs*
【中图分类号】 R781.1　　**文献标志码** A　　**DOI**：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.006

Detection of activity of signal molecule AI-2 of streptococcus mutans isolated from children with different caries experience

CHEN Lan[1,3]，HAN Linxiu[2]，WU Ju[1,3]，XU Ai[4]，LIU Xingrong[1]
1.*Department of Pediatric Dentistry，the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China;* 2.*Department of Stomatology，People's Hospital of Kaizhou District，Kaizhou 405400，China;* 3.*Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory，Southwest Medical University，Luzhou 646000，China;* 4.*Department of Endodontics，the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China*

【Abstract】Objective To explore the expression differences of the quorum sensing molecule AI-2 of streptococcus mutans isolated from children with different caries experience. **Methods** Streptococcus mutans isolated from children with different caries experience (high caries strain，medium caries strain，and non-cariogenic strain) were used as the experimental subjects. Vibrio harveyi BB170 was used to detect the yield of AI-2 in each group. Real-time quantitative PCR detecting system (RT-qPCR) was used to measure the high caries strain's expression of *LuxS* and *pfs* genes at different growth periods，and the relationship between the synthesis of AI-2 and *LuxS* and *pfs* genes was analyzed. **Results** All the strains produced AI-2，the high caries strain had the highest yield. AI-2 expression was found in the high caries strains at different growth stages. The AI-2 of high caries strain had low expression in the lag phase and pre-log phase，and then reached the peak at the post-log phase (19.00 ± 0.90，$P < 0.05$)，which was 19 times higher than that of the negative control，and began to decline in the stable phase. RT-qPCR results showed that *LuxS* and *pfs* genes of high caries strains had the highest expression in the post-log phase，which were 10.47 ± 0.35 and 7.22 ± 0.06 respectively; The transcriptional level of *LuxS* and *pfs* genes were consistent with that of AI-2，but the correlation with *LuxS* was higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Streptococcus mutans isolated from children with higher caries experience produced more signal molecule AI-2; and the correlation between AI-2 activity and *LuxS* gene transcription level was higher than that of *pfs* gene transcription level.

【Key words】 Streptococcus mutans; Quorum sensing; AI-2; *LuxS*; *pfs*

基金项目：四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研项目(LY53)；四川省卫生厅科研课题(100247)；四川省教育厅科研基金(13ZA0235)
第一作者简介：陈　岚，硕士研究生。
通信作者：刘兴容，教授，硕导。E-mail：liuxingrong163@163.com
引用本文：陈岚，韩林秀，吴菊，等. 不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌信号分子AI-2活性检测 [J]. 西南医科大学学报.2022,45(5)：393-398.
DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.006

群体感应（quorum sensing，QS）是细菌与细菌间进行信息交流，用以感受种群密度变化并协调种群间行为改变的重要通讯系统[1]，QS系统有不同的类型，其中*LuxS*/AI-2广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中，是种间通用的交流系统[2]。*LuxS*/AI-2群体感应系统调控着细菌的多种重要生理过程，如生物发光、毒素的分泌、抗生素的合成、生物膜的形成、生物膜内质粒的转移以及耐药性等[3-7]，因此深入研究AI-2分子具有重要意义。

龋病是由牙表面致病性菌斑生物膜引起的一种典型口腔感染性疾病[8]，菌斑生物膜中存在着多种细菌，变异链球菌（*Streptococcus mutans*，*S.mutans*）作为其中的关键细菌[9]，能产生利于致龋生物膜形成和种间相互作用的信号分子[10]。研究发现牙菌斑中存在信号分子AI-2，能调节相关毒力因子的表达，在致龋过程发挥重要作用[11-12]。变异链球菌不同菌株之间致龋力存在很大差异[13]，而不同致龋性变异链球菌信号分子AI-2的产生情况目前尚未见相关研究报道。本实验以课题组前期分离保存的不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌临床分离株为实验对象，采用简便易行的哈维弧菌BB170生物学发光法定量检测[14]不同菌株间AI-2的表达差异，为进一步研究AI-2如何调节变异链球菌的致龋作用奠定基础。本研究经西南医科大学附属口腔医院伦理委员会审核同意。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株（高龋株、中龋株、无龋株）均由本实验课题组前期分离，保存于西南医科大学口颌面修复重建和再生实验室；变异链球菌国际标准株UA159（简称UA159标准株）由四川大学华西口腔医学院国家级重点实验室提供；哈维弧菌BB170（*vibrio harveyi* BB170）购自北纳创联生物技术有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

BHI培养基、2216E培养基（青岛高科园海博生物技术有限公司）；甘露醇、蜜二糖、棉子糖、山梨醇、精氨酸双水解酶肉汤细菌微量生化鉴定管、七叶苷培养基（北京陆桥技术有限责任公司）；总RNA提取试剂盒（天根生化科技有限公司）；逆转录试剂盒、SYBR Green荧光定量PCR试剂盒（TOYOBO公司，日本）；*Luxs*引物、*pfs*引物、*16SrRNA*引物（上海生工生物科技有限公司）。

低温高速离心机，RT-qPCR仪（Thermo公司，美国）；多功能酶标仪（Bio-Tek公司，美国）；核酸蛋白检测仪（凯奥公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌的复苏、培养及体外非应激条件下生长曲线的测定　将3组变异链球菌及UA159标准菌株复苏后，于BHI固体培养基上平板划线，37 ℃厌氧（80% N_2、10% H_2、10% CO_2）培养至24 h时进行革兰染色和生化鉴定。挑选每组菌株的单菌落至BHI液体培养基中，每组3管，37 ℃厌氧（80% N_2、10% H_2、10% CO_2）培养24 h。3000 r/min离心15 min，弃上清液，PBS液漂洗，重复3次，重悬，调节吸光度（optical density，OD）$_{600}$=1；37 ℃厌氧培养18 h，每隔2 h从每组中各取出1管放置于4 ℃冰箱保存。每组每管分别吸取100 μL加入标准96孔板，每管样本取3次，多功能酶标仪测每组OD_{600}值，绘制细菌生长曲线。

1.3.2 各组变异链球菌信号分子AI-2的活性检测

1.3.2.1 各菌株无菌上清液的制备　将各菌株按2%接种于BHI液体培养基中，37 ℃厌氧培养至16 h（稳定期），3 000 r/min离心15 min，收集上清液，用0.22 μm滤菌器过滤除菌；将哈维弧菌BB170接种于AB培养基，28 ℃连续培养12 h，以相同方法收集无菌上清液作为阳性对照；用0.22 μm的滤菌器分别过滤AB培养基和BHI液体培养基，作为阴性对照和介质对照。各组滤液标记后于-80 ℃保存。

1.3.2.2 信号分子AI-2的活性检测　将哈维弧菌BB170菌株接种于AB培养基中，28 ℃、90 r/min连续振荡培养12 h调节至OD_{600}为0.8~1，菌液用新鲜AB培养基按照1∶5 000的比例稀释，振荡混匀，将各组变异链球菌无菌上清液及阳性、阴性、介质对照与与上述稀释过的哈维弧菌BB170培养液按照1∶100的比例混合均匀，28 ℃振荡培养。1～6 h内每间隔1 h，吸取200 μL于96孔全黑酶标板中，用多功能酶标仪检测其荧光强度值，样品与对照均取3个复孔，实验重复3次。

在6 h内，以阴性对照组的荧光强度值降到最低的时间点为基准，阴性对照组的相对荧光强度值为1，信号分子AI-2用相对荧光强度表示。以时间为横坐标，对应时间点的荧光强度值为纵坐标，然后根据得出的数据绘制曲线。计算公式如下：

待测组的相对荧光强度值＝待测样品的荧光强度值/介质对照组的荧光强度值；

阳性对照组的相对荧光强度值＝阳性对照的荧光强度值/阴性对照组的荧光强度值。

1.3.3 不同生长时期AI-2的活性检测

1.3.3.1 变异链球菌高龋株不同生长时期AI-2的活性检测　将高龋株按2%的比例接种于BHI液体培养基中，共3管，37 ℃厌氧（80% N_2、10% H_2、10% CO_2）培养16 h，3 000 r/min离心15 min，PBS洗涤，重复3次，BHI液体培养基重悬调节OD_{600}为1，按1.3.2方法收集在各生长时期（迟缓期、对数前期、对数中期、对数后期、稳定期）的无菌上清液，菌体用于总RNA的提取。将各

组上清液以同样方法进行AI-2的活性检测。

1.3.3.2 不同时间点信号分子AI-2与OD_{600}的关系　将接种于BHI液体培养基中的高龋菌株在37 ℃厌氧（80%N_2、10%H_2、10%CO_2）培养4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h后，各时间点各3管，测定OD_{600}值。并测定在不同时间点信号分子AI-2的活性，收集数据，比较OD_{600}与信号分子AI-2的关系。

1.3.4 RT-qPCR法检测*LuxS*和*pfs*基因的转录水平

1.3.4.1 细菌总RNA的提取及浓度测定　取不同生长时期的变异链球菌高龋株菌体，采用细菌总RNA提取试剂盒提取菌株的RNA，在核酸蛋白检测仪上测定RNA浓度。

1.3.4.2 引物设计与合成　在NCBI Genbank上搜索*LuxS*及*pfs*基因的DNA全长序列，应用Oligo7设计内参引物（*16SrRNA-F*和*16SrRNA-R*）及特性引物（*LuxS-F*和*LuxS-R*，*Pfs-F*和*Pfs-R*），由上海生工生物股份有限公司合成，具体见表1。

表1 *16SrRNA*、*LuxS*、*Pfs*引物序列

Table 1 Primer sequences of *16SrRNA*, *LuxS* and *pfs*

基因名称	引物
16SrRNA-F	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG
16SrRNA-R	CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA
LuxS-F	CGTCAGCGTATTGACGGGAT
LuxS-R	ACTTGCTTTGATGACTGTGGC
Pfs-F	GCAAAGCGGTGTTGGCAAAGTC
Pfs-R	CGCTAAAGCTCCTGCTGAACCTG

1.3.4.3 实时荧光定量PCR　根据cDNA逆转录试剂盒说明书配制20 μL反应体系，配制过程均在冰上进行，20 μL反应体系：ddH_20 2.5 μL、Forward Primer 3 μl、Reverse Primer 3 μL、Template cDNA1.5 μL、SYBR qPCR Mix 10 μL。冰浴条件下行RT-qPCR，反应参数：95 ℃ 1 min，循环1次，95 ℃ 15 s，60 ℃ 10 s，72 ℃ 30 s，循环45次，72 ℃ 5 min，循环1次。分析各个时间点的菌株*LuxS*、*pfs*及内参*16SrRNA*基因的溶解曲线、扩增曲线，数据分析采用相对定量分析—$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算*LuxS*、*pfs*基因的表达水平。

1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0对各组数据进行统计分析，实验结果用$\bar{x} \pm s$表示，多样本比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学和生化鉴定结果

各组变异链球菌经革兰染色，光镜下（×100）观察细菌形态基本一致，均呈长短不一、链状排列，革兰染色均为紫色阳性，见图1。

如表2所示，高、中、无龋株及UA159标准株均可分解山梨醇、甘露醇、蜜二糖、棉子糖使其指示剂变黄，水解七叶苷使指示剂生成黑色沉淀，但均不能水解精氨酸。三组变异链球菌株的生化鉴定结果与变异链球菌标准株UA159的生化性状一致。

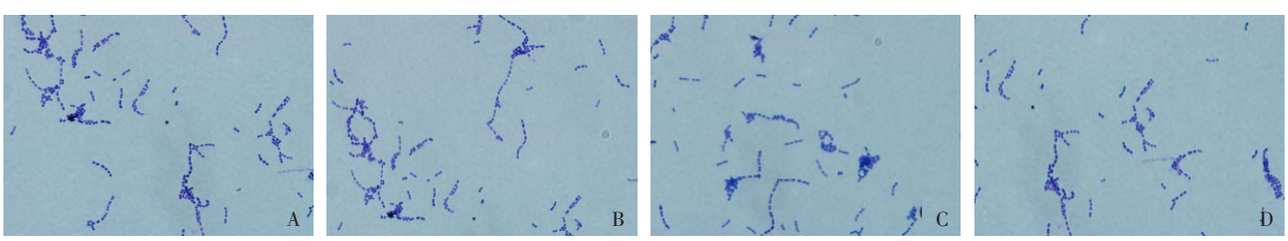


图1 高龋株（1A）、中龋株（1B）、无龋株（1C）及UA159标准株（1D）（革兰染色，×100）

Figure 1 High caries strains (1A), medium caries strains (1B), caries free strains (1C) and ua159 standard strains (1D) (Gram staining, × 100)

表2 生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results

菌株	山梨醇	甘露醇	蜜二糖	棉子糖	精氨酸	七叶苷
UA159标准株	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	(+)
高致龋性菌株	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	(+)
中致龋性菌株	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	(+)
无致龋性菌株	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	(+)
无菌蒸馏水	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

2.2 体外非应激条件下生长曲线测定

在非应激环境下，四组变异链球菌株生长曲线趋势基本一致，见图2。在0～4 h生长缓慢，处于生长迟缓期；在4～8 h增殖速度加快，处于对数生长期；从8 h开始，速度减缓，12 h进入稳定期。高龋株各时间点的菌液浓度均高于无龋株，其差异有统计学意义（$P < 0.05$）；在4 h后，中龋株、UA159标准株菌液浓度均高于无龋株，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

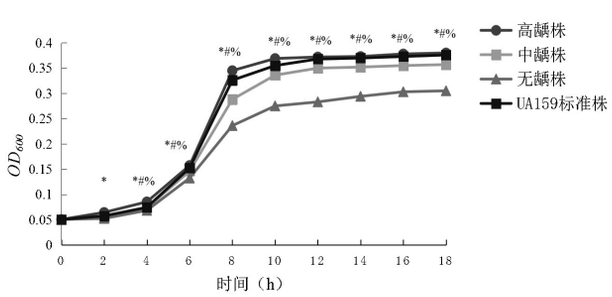


图2 四菌株生长曲线测定结果

Figure 2 Growth curves of four strains

注：*：高龋株与无龋株比较，$P < 0.05$；#：中龋株与无龋株比较，$P < 0.05$；%：UA159标准株与无龋株比较，$P < 0.05$

2.3 各组变异链球菌AI-2的活性检测结果

以哈维弧菌BB170为阳性对照，AB培养基为阴性对照，利用哈维弧菌BB170测各组菌株AI-2的产生情况。由图3可知，在0～3 h内，随着培养时间的延长，阳性对照、阴性对照、介质对照的荧光强度均在不断降低，在3 h时阴性对照的荧光强度降到最低，随后开始升高，说明时间达到3 h时，指示菌产生的信号分子AI-2浓度达到诱导发光的时间阈值。因此，以3 h时的荧光强度值为基准计算相对荧光强度，表示信号分子AI-2活性。

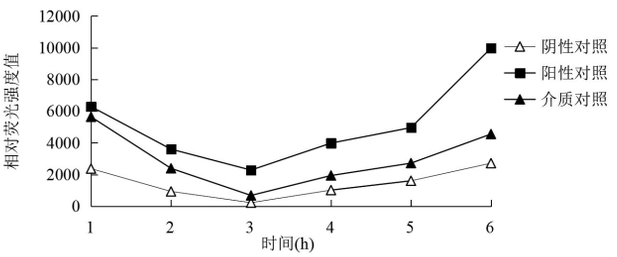


图3 不同培养时间各样品的荧光强度值

Figure 3 Fluorescence intensity values of samples at different culture times

三组变异链球菌均可以产生信号分子AI-2，相对荧光强度均大于阴性对照（图4）。其中高龋株的相对荧光值最大，不仅高于中龋株和无龋株，还明显高于阳性对照（$P < 0.05$），因此在后续实验中选择高龋株作为高产信号分子AI-2菌株。

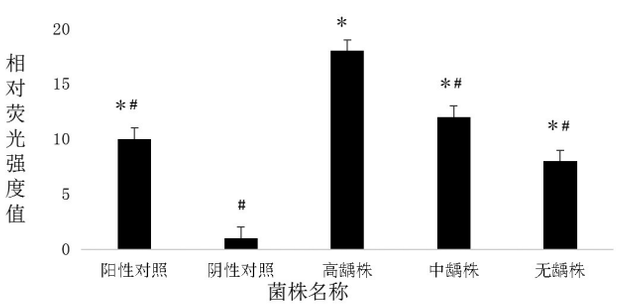


图4 各组变异链球菌相对荧光强度比较

Figure 4 Comparison of relative fluorescence intensity of Streptococcus mutans in each group

注：*：各组与阴性对照比较，$P < 0.05$；#：各组与高龋株比较，$P < 0.05$

2.4 不同生长时期高龋株AI-2的活性检测

对高龋株不同生长时期AI-2活性检测结果表明，在不同生长时期均有AI-2产生，但在迟缓期、对数前期其产生AI-2较少，从对数中期开始逐渐增加，到对数后期达峰值，显著高于其他生长时期（$P < 0.05$），产生的AI-2为阴性对照的19倍，并在稳定期开始下降，如图5所示。

由图6可知，在4～16 h内，高龋株的OD_{600}随着培养时间不断上升，在16 h后达到一个稳定的状态。而在4～12 h内，AI-2信号随着培养时间不断增加，在12 h之后开始下降。

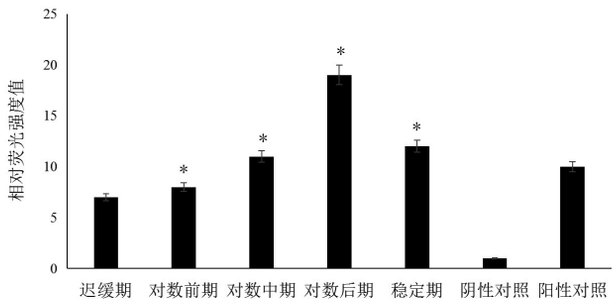


图5 高龋株不同生长时期相对荧光强度比较

Figure 5 Comparison of relative fluorescence intensity of high caries strains at different growth stages

注：*与阴性对照组比较，$P < 0.05$

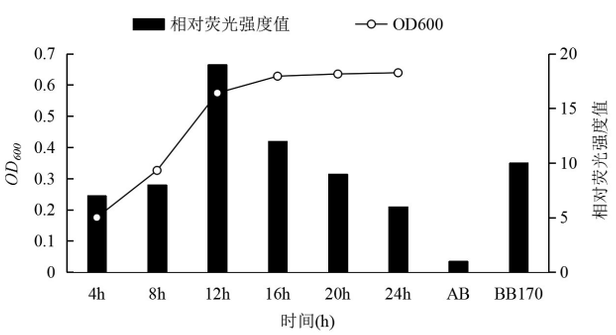


图6 高龋株上清液相对荧光强度与OD_{600}的关系

Figure 6 Relationship between relative fluorescence intensity of supernatant of high caries strains and OD_{600}

2.5 不同生长时期*LuxS*基因和*pfs*基因的mRNA转录水平

应用$2^{-\triangle\triangle CT}$法分析不同时期*LuxS*基因、*pfs*基因的mRNA水平。从表3、图7中可知，*LuxS*和*pfs*基因的相对表达量随时间的增加趋势大致相同，在迟缓期到对数后期的过程中，*LuxS*和*pfs*的mRNA水平逐渐升高，至对数后期达最高，*LuxS*为10.47 ± 0.35，大约为迟缓期的10.5倍，*pfs*为7.22 ± 0.06，为迟缓期的7.2倍，均在稳定期开始下降。

表3 变异链球菌高龋株不同生长时期*LuxS*、*pfs*基因表达量

（$\bar{x} \pm s, n = 3$）

Table 3 *LuxS* and *pfs* gene expressions of high caries strains of Streptococcus mutans at different growth stages（$\bar{x} \pm s, n = 3$）

生长时期	相对表达量	
	*LuxS*基因	*pfs*基因
迟缓期	1.07 ± 0.32	1.01 ± 0.18
对数前期	2.20 ± 0.35	1 .24 ± 0.24
对数中期	4.23 ± 0.40	2.83 ± 0.54
对数后期	10.47 ± 0.35	7.22 ± 0.06
稳定期	3.87 ± 0.41	3.03 ± 0.28
F	288.42	193.74
P	$P < 0.05$	$P < 0.05$

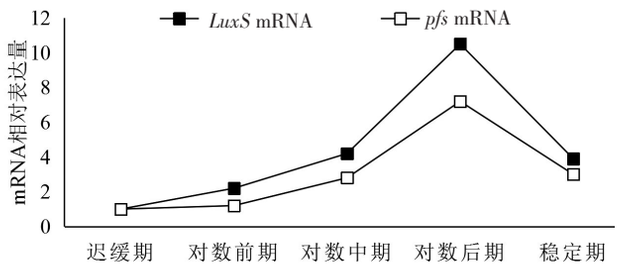


图7 高龋株不同生长时期*LuxS*基因、*pfs*基因mRNA转录水平

Figure 7 mRNA transcription levels of *LuxS* gene and *pfs* gene in different growth stages of high caries strains

3 讨论

儿童龋病是一项全球性的健康问题，患病率从23%到90%不等[15]，变异链球菌作为首要的致龋菌[16]，与多种细菌一起定植在口腔牙菌斑生物膜内，在儿童龋病中发挥重要作用。变异链球菌不同菌株间生长特性略有差异。在体外非应激条件下，不同龋敏感儿童口腔变异链球菌与UA159标准株的生长周期基本相似，均有迟缓期、对数期、稳定期。高龋株与标准株生长速度相近，明显快于中龋株和无龋株（$P<0.05$）。说明在相同基因型不同龋敏感性的变异链球菌中，致龋敏感性高的变异链球菌，生长繁殖速度较快。

以哈维弧菌BB170作为报告菌株检测不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株AI-2的表达情况，结果致龋敏感性越高的变异链球菌株，产生的AI-2越多，说明密度感应系统调控变异链球菌致龋能力，然而具体是通过何种机制进行识别和调控目前还尚不清楚。研究发现，AI-2可诱导变异链球菌葡糖基转移酶（glucosyltransferase,GTF）的表达，GTF所合成的非水溶性葡聚糖是变异链球菌致龋的主要毒力因子之一[17-18]。因此我们推测本实验中高龋株产生的AI-2更多可能是与GTF表达更多有关。

在对许多细菌密度感应系统的研究中发现，胞外AI-2的活性在对数中晚期达到峰值，在稳定期开始下降[19]。如曹素芳在奶牛隐性乳房炎大肠杆菌AI-2的研究结果表明，从对数中期开始细菌开始大量表达AI-2，到对数后期达到高峰，为阴性对照的12倍[20]。在本实验中，高龋株在整个生长时期均有AI-2产生，在对数后期生成的AI-2达到最高峰。与上述的研究是相符的。AI-2在稳定期开始下降可能是因为变异链球菌生长繁殖的过程中，胞外AI-2不断增加，当积累到一定程度，细菌周围的AI-2可能会发生内化作用，从而参与调控某些重要功能[21]。目前研究较为清楚的是弧菌、大肠杆菌和沙门氏菌的AI-2信号分子的传递及内化途径。而有关变异链球菌的AI-2的内化途径目前尚不清楚。

已知*LuxS*基因在细菌中高度保守，信号分子AI-2的合成途径也高度保守[22]，是以pfs蛋白和LuxS蛋白催化底物S-腺苷高半胱氨酸酸（S-adenosylhomocysteine，SAH）合成的。也有研究利用纯化表达的LuxS蛋白和pfs蛋白在体外成功合成了具有生物活性的变异链球菌的AI-2信号分子，证实了两种酶的生物学活性[23]。本实验为了研究变异链球菌产生的AI-2信号分子与*LuxS*、*pfs*基因转录水平间的关系，检测了变异链球菌高龋株在不同生长时期的*LuxS*基因和*pfs*基因的转录水平，发现AI-2产生水平与*LuxS*转录水平具有高度相关性，而与*pfs*转录水平相关性相对略低，结果与白灏等[24]在禽致病性大肠杆菌的AI-2产生水平与*LuxS*基因的转录水平具有高度相关性的研究保持一致。推测原因可能是LuxS是直接合成AI-2的酶，可直接与S-核苷高半胱氨酸（S-ribosylhomocysteine，SRH）底物发生反应，直接反应了*LuxS*的转录水平，而pfs是在底物SAH的作用下生成SRH，然后间接形成AI-2，在这过程中可能与细胞的代谢状态有关，也有可能本身*pfs*的表达相对较低，具体机制仍需进一步研究。目前龋病致病性生物膜中微生物间相互作用机制尚不明确[25]，因此深入研究AI-2信号通路有助于进一步研究牙菌斑生物膜的形成，发现群体感应系统与变异链球菌致龋性基因的关系，为龋病的防治找到新的方向。

4 结论

本实验结果发现不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌临床分离株均能产生信号分子AI-2，致龋敏感性越高的菌株AI-2产量越高。而该高龋株在不同生长时期AI-2的生成与*LuxS*、*pfs*基因相关，且与*LuxS*基因的相关性更高。本结论可为进一步研究群体感应系统调控变异链球菌致病性的具体机制提供参考。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] ABISADO RG, BENOMAR S, KLAUS JR, *et al*. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions[J]. mBio, 2018, 9(3): e02331-17.

[2] HAQUE S, YADAV DK, BISHT SC, *et al*. Quorum sensing pathways in gram-positive and -negative bacteria: potential of their interruption in abating drug resistance[J]. J Chemother, 2019, 31(4): 161-187.

[3] VIDAL JE, SHAK JR, CANIZALEZ-ROMAN A. The CpAL quorum sensing system regulates production of hemolysins CPA and PFO to build Clostridium perfringens biofilms[J]. Infect Immun, 2015, 83(6): 2430-2442.

[4] GUO MH, FANG ZJ, SUN LJ, *et al*. Regulation of thermostable direct hemolysin and biofilm formation of Vibrio parahaemolyticus by quorum-sensing genes luxM and luxS[J]. Curr Microbiol, 2018, 75(9): 1190-1197.

[5] YADAV MK, VIDAL JE, GO YY, *et al*. The LuxS/AI-2 quorum-sensing system of Streptococcus pneumoniae is required to cause disease, and to regulate virulence- and metabolism-related genes in a rat model of middle ear infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 138.

[6] 于艳超, 王莉莉, 潘巧, 等. 肠炎沙门菌luxS缺失株的构建及其生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1291-1298.

[7] ZHAO XH, YU ZX, DING T. Quorum-Sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 425.

[8] BOWEN WH, BURNE RA, WU H, *et al*. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(3): 229-242.

[9] MOTEVASSELIAN F, ZIBAFAR E, YASSINI E, *et al*. Adherence of Streptococcus mutans to microhybrid and nanohybrid resin composites and dental amalgam: an in vitro study[J]. J Dent (Tehran), 2017, 14(6): 337-343.

[10] NAKANISHI Y, YAMAMOTO T, OBANA N, *et al*. Spatial distribution and chemical tolerance of Streptococcus mutans within dual-species cariogenic biofilms[J]. Microbes Environ, 2018, 33(4): 455-458.

[11] 储曼茹, 魏常博. LuxS/AI-2密度感应系统及其与口腔致病菌相关研究的进展[J]. 口腔生物医学, 2019, 10(4): 222-226.

[12] YUAN KY, HOU LL, JIN QQ, *et al*. Comparative transcriptomics analysis of Streptococcus mutans with disruption of LuxS/AI-2 quorum sensing and recovery of methyl cycle[J]. Arch Oral Biol, 2021, 127: 105137.

[13] 胡桐楠, 郑伟, 李少华, 等. 不同pH条件下高低致龋性变异链球菌sRNA SpR19及其潜在靶标GroEL的表达变化[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(6): 802-806.

[14] 林才云, 姚琳, 李凤铃, 等. LuxS/AI-2群体感应系统及其对细菌致病性和耐药性的调控[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 5983-5991.

[15] CHEN KJ, GAO SS, DUANGTHIP D, *et al*. Prevalence of early childhood caries among 5-year-old children: a systematic review [J]. J Investig Clin Dent, 2019, 10(1): e12376.

[16] CUI T, LUO W, XU L, *et al*. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen Streptococcus mutans [J]. Curr Issues Mol Biol, 2019, 32: 601-44.

[17] ZHANG Z, LIU YD, LU M, *et al*. Rhodiola rosea extract inhibits the biofilm formation and the expression of virulence genes of cariogenic oral pathogen Streptococcus mutans[J]. Arch Oral Biol, 2020, 116: 104762.

[18] NIAZY AA. LuxS quorum sensing system and biofilm formation of oral microflora: a short review article[J]. Saudi Dent J, 2021, 33(3): 116-123.

[19] 陈伟. 细菌QS系统LuxS功能研究进展[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(7): 1083-1088.

[20] 曹素芳, 吴迪, 孔兰芳, 等. 奶牛隐性乳房炎致病性大肠杆菌AI-2信号分子检测[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(8): 9-12, 16.

[21] 张腾, 贺银凤. 坚强肠球菌SQ-3-2基于Lux S群体感应系统信号分子AI-2的检测及方法优化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 168-173.

[22] WANG Y, WANG YX, SUN LY, *et al*. The LuxS/AI-2 system of Streptococcus suis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(17): 7231-7238.

[23] 张鹰, 李明勇, 霍丽, 等. 变异链球菌自诱导物2信号分子的体外合成与活性检测[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(5): 519-523.

[24] 白灏, 韩先干, 刘蕾, 等. 影响禽致病性大肠杆菌信号分子AI-2产生的因素分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3220-3226.

[25] INABA T, OBANA N, HABE H, *et al*. Biofilm formation by Streptococcus mutans is enhanced by indole via the quorum sensing pathway[J]. Microbes Environ, 2020, 35(2): ME19164.

（2021-05-12 收稿, 2022-05-09 修回）