基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0281-04

生物膜状态变异链球菌临床株合成胞外多糖能力的研究

黄晓晶[1],江 山[1],蔡志宇[2],闫福华[3],钟 声[1]

(1. 福建医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,福州 350002;2. 福建医科大学附属协和医院口腔科,福州 350001;3. 福建医科大学附属口腔医院牙周科,福州 350002)

【摘 要】目的:了解不同致龋力的变异链球菌临床分离株(593 号高致龋力临床株和 18 号低致龋力临床株)在生物膜状态不同时间段合成胞外多糖的能力差异。方法:①在聚苯乙烯塑料片上分别形成 3、12、20 h 变异链球菌生物膜标本,用异硫氰酸荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A 对其中的胞外多糖进行染色,激光共聚焦扫描显微镜观察。②采用静置法培养形成粘附生长的细菌,蒽酮法测定 3 ~ 24 h 其合成胞外多糖的量。结果:①胞外多糖与染料结合后发出绿色荧光,各时间段 593 号临床株绿色荧光的分布较 18 号临床株更致密和广泛。②3 ~ 20 h 593 号临床株合成水溶性葡聚糖能力强于 18 号临床株($P<0.05$);3 ~ 16 h 593 号临床株合成水不溶性葡聚糖能力强于 18 号临床株($P<0.05$);其他时间点二者合成胞外多糖的能力无显著性差异($P>0.05$)。结论:在生物膜形成过程中两菌株合成胞外多糖量随时间延长而增加,593 号临床株在生物膜形成早期 3 ~ 16 h 更强的合成胞外多糖能力(含水溶性和水不溶性葡聚糖),可能是其具高致龋力的原因之一。

【关键词】变异链球菌;生物膜;激光共聚焦扫描显微镜;胞外多糖;葡聚糖

【中国图书分类法分类号】R781.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-05

The difference of the ability to synthesize exopolysaccharides of clinical strains of biofilm *streptococcus mutans*

HUANG Xiao-jing, et al

(*Department Dental Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital, Fujian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the exopolysaccharides produced by biofilm cells of clinical strains 593 and 18 and the difference between the two strains. *Methods*: ① *Streptococcus mutans* biofilms formed on polystyrene plastic sheets in 3, 12 and 20 hours respectively, exopolysaccharides distribution, after fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A staining, were visualized by confocal scanning laser microscopy. ② The amounts of exopolysaccharides by adhesive streptococcus mutans in different culture time were determined by the anthrone method. *Results*: After combining with the fluorescent stain, the exopolysaccharides showed green light. Strain 593 in biofilm possessed stronger ability to synthesize exopolysaccharides than strain 18, especially the amount of water soluble glucans in 3 ~ 20 h and water insoluble glucans in 3 ~ 16 h ($P<0.05$). *Conclusion*: The stronger ability of biofilm strain 593 to synthesize exopolysaccharides in the early biofilm formation stage during the 3 ~ 16 h may be the reason for its higher cariogenic ability.

【Key words】*streptococcus mutans*; biofilm; microscopy; confocal laser scanning; exopolysaccharide; glucans

变异链球菌(*Streptococcus mutans*,变链)是致龋菌斑的主要组成菌,已有研究证实生物膜粘附条件下,变链合成水溶性、水不溶性胞外多糖的能力均明显增强[1],然而,这些结果都是基于对变链国际参考菌株的研究得出的[1,2]。现实中,不同个体菌斑中定植的变链菌株其基因型和致龋力均可能不同于国际参考菌株[3-7],有报道指出高龋和无龋患者口内定植的变链临床分离株在浮游状态合成胞外多糖的能力存在明显差异[5,8]:高致龋力临床株合成胞外多糖量明显高于低致龋力临床株。因此,本研究采用异硫氰酸荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A(Fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A, FITC-ConA)标记生物膜中的胞外多糖,激光共聚焦扫描显微镜(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)观察其分布情况,并结合蒽酮法定量分析生物膜状态不同临床株的胞外多糖分泌量,从而定性、定量探讨高、低致龋力临床株在生物膜形成各时期合成胞外多糖量的变化及胞外多糖分布情况,并分析导致其差异的可能原因。

作者介绍:黄晓晶(1971-),女,主任医师,博士,研究方向:龋病病因和防治。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30500564);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助项目(编号:NCETFJ-0612)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 TPY 液体培养基[1.5%(w/v)胰蛋白胨,0.4%

(w/v)酵母提取物,1%(w/v)葡萄糖,0.6%(w/v)KH_2PO_4,0.2%(w/v)$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,0.2%(w/v)Na_2CO_3,0.2%(w/v)NaCl,pH 7.0];FITC-ConA(Molecular Probes,USA);丙酮(广东省汕头市西陇化工厂,中国);葡聚糖(上海生工,中国);蒽酮(上海生工,中国)。

1.1.2 实验菌株 变链临床分离株 593 号和 18 号临床株由本课题组于四川大学华西口腔医学院龋病研究室分离、鉴定及保存。其中 593 号临床株分离自高龋患者,18 号临床株分离自无龋健康人,并经体外致龋实验证实 593 号临床株的体外黏附和致龋力强于 18 号临床株[4-7]。

1.1.3 主要仪器 YQX-Ⅱ厌氧培养箱(上海新苗医疗器制造有限公司,中国);聚苯乙烯培养皿(Dow Corning,Germany);全自动酶联免疫测定仪(Human,Germany);CLSM(ZeissLSM 510,Germany);水平旋转仪(江苏康健,中国);细胞刮(Corning,Mexico)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将变链 593 号和 18 号临床株复苏传代厌氧培养 48 h(37℃,80%N_2,10%CO_2,10%H_2),经镜检证实为纯培养后用 PBS 液调节菌浓度为 OD(A_{630})1.0,5%体积接种于预热 37℃含 1%蔗糖 TPY 液体培养基中配制成标准菌液备用。

1.2.2 CLSM 观察生物膜状态变链胞外多糖分布情况

1.2.2.1 生物膜标本制备 在直径 100 mm 的培养皿内放入环氧乙烷灭菌的 1 cm × 1 cm 聚苯乙烯塑料片,取标准菌液20 ml 于培养皿中,厌氧静置培养 3、12、20 h。每个时间点培养 4 个标本。实验设立背景对照,即将空白聚苯乙烯片放入 TPY 液体培养基中静置培养 24 h。

1.2.2.2 荧光染液的配制 配置浓度为 10 mg/L FITC-ConA 溶液,FITC-ConA 可与细菌合成的胞外多糖特异结合发出绿色荧光。

1.2.2.3 生物膜中胞外多糖荧光染色 将上述生物膜标本取出,用 PBS 液冲洗 2 次,洗去表面松散粘附的细菌,置于载玻片上,取 200 μl 上述荧光染液滴于生物膜标本上,于室温、黑暗环境中孵育 30 min 后,加入 200 μl PBS 液缓冲液终止反应。背景对照组同法染色。

1.2.2.4 封片 黑暗环境下,在生物膜标本上滴 1 滴 p-苯二胺抗淬灭剂(90%甘油,10%PBS 液,其中 p-苯二胺浓度为 2~7 mmol/L,pH 8.5~9.0),再滴 1 滴 PBS 液缓冲液后,盖上盖玻片,4℃避光存放并立即镜检。

1.2.2.5 CLSM 观察 将上述染色好的生物膜标本倒置于 CLSM 下观察。每个生物膜标本由外(生物膜游离的一面)向内(生物膜和聚苯乙烯塑料片相贴的一面)逐层沿 Z 轴扫描,步距(Z 轴)为 1 μm。通过专业软件处理,得到生物膜中胞外多糖分布的断层扫描图像,经软件组合后得到生物膜中胞外多糖分布的三维图像。观察条件:氩激光(514~488 nm),物镜 × 20,物镜 × 10,水镜 × 63,目镜 × 10。

1.2.2.6 图像分析 应用 ImageJ 图像分析软件计算连续扫描图像最内层、中间层及最外层绿光面积,分别代表生物膜内层、中间层及外层的胞外多糖密度情况。胞外多糖密度计算公式为:每层胞外多糖密度 = 每层绿光面积/每层生物膜面积

1.2.3 生物膜状态变链合成水溶性和水不溶性葡聚糖能力检测

1.2.3.1 生物膜状态变链培养 取标准菌液 20 ml 于直径 100 mm 的聚苯乙烯培养皿中,每时间段各 6 个培养皿,每菌株共 36 个样本,分别各取 3 个培养皿置于水平旋转仪,50 r/min 进行摇动培养以获得全浮游生长的细菌,另 3 个培养皿静置培养,以获得大部分粘附生长的细菌,放入厌氧箱中分别培养 3、6、12、16、20、24 h。

1.2.3.2 生物膜状态变链菌量测定 分别收集各时间段摇动培养浮游状态变链和静置培养浮游状态变链,4℃,3 000 g 离心 15 min。用细胞刮器刮取静置培养粘附于培养皿底部的生物膜状态细菌,并重悬于去除浮游细菌后的培养上清液中,4℃,3 000 g 离心 15 min。然后分别计算测出摇动培养浮游状态、静置培养浮游状态、静置培养生物膜状态细菌菌量。

1.2.3.3 生物膜状态不同时间段变链合成水溶性和水不溶性葡聚糖量测定 合并属于同一培养皿的细菌与培养液,4℃以 3 000 g 离心 20 min,弃上清液。变链沉淀物用 5 ml PBS 液洗 2 次,离心,合并上清液检测水溶性葡聚糖含量。水洗后的变链加 0.4 mol/L NaOH 溶液 5 ml 洗涤 3 次,离心,合并上清液检测水不溶性葡聚糖含量。蒽酮法测定水溶性及水不溶性葡聚糖的含量。

1.2.3.4 生物膜状态不同时间段变链合成水溶性和水不溶性葡聚糖能力计算

浮游状态细菌合成胞外多糖的能力 = 合成胞外多糖的量/浮游状态细菌的量

生物膜状态细菌合成胞外多糖的能力 =(静置培养中细菌合成胞外多糖的量 - 浮游状态细菌合成胞外多糖的能力 × 静置培养中浮游细菌的量)/ 生物膜状态细菌的量

1.2.4 统计分析 采用 SPSS15.0 软件进行分析,运用单因素方差分析法比较判断变链不同菌株间以及各时间段生物膜状态合成葡聚糖能力各组间差别,用 SNK 法进行两两比较,α 值设为 0.05。

2 结 果

2.1 CLSM 观察变链生物膜状态胞外多糖分布情况

2.1.1 背景观察 空白聚苯乙烯塑料片荧光染色后,CLSM 观察,未观察到荧光物质存在。

2.1.2 变链生物膜状态不同时间段胞外多糖分布情况

2.1.2.1 两菌株共同点 见图 1~3。

2.1.2.2 两菌株差异 两菌株的荧光分布情况存在差异,各时间段 593 号临床株绿色荧光的强度较 18 号临床株更强,分布也更广泛、致密。

2.1.2.3 20 h 变链生物膜标本观察

2.1.2.4 胞外多糖分布的三维结构重建 将 20 h 变链生物膜扫描图像应用专业软件进行三维重建,得到其三维立体结构:结构不均匀,表面凹凸不平。

2.1.3 不同时间段变链生物膜胞外多糖密度

不同时间段各层面胞外多糖密度数据见表 1,由表中数

据可看出两菌株总体趋势相似：各层面 3 h 时胞外多糖密度均最低，随时间延长胞外多糖密度逐渐增加，3 h 与 12、20 h 的胞外多糖密度差异有统计学意义（$P<0.05$），而 12 与 20 h 之间差异则无统计学意义（$P>0.05$）。

2 菌株各时间段各层面之间胞外多糖密度比较数据见表 1。各时间段各层面 593 号临床株的胞外多糖密度均显著高于 18 号临床株（$P<0.05$）。

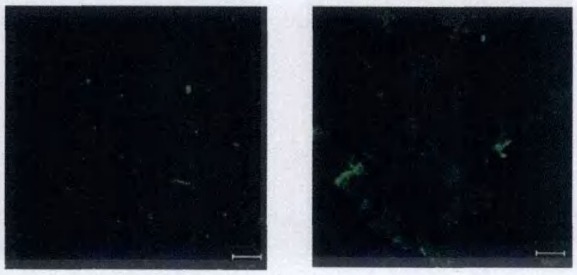
2.2 蒽酮法测定变链生物膜状态合成水溶性和水不溶性葡聚糖的情况

不同时间段变链生物膜状态合成水溶性、水不溶性葡聚糖能力的数据见表 2，两菌株总体规律相似，以 593 号菌株为例绘制趋势图（图 6）。水溶性胞外多糖的合成呈单峰曲线，12 h 合成水溶性胞外多糖能力最强，3~16 h 差异有统计学意义（$P<0.05$），16~24 h 趋于稳定，有波动，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；水不溶性胞外多糖的合成呈双峰曲线，3 h 合成水不溶性胞外多糖能力最强，之后下降，6 h 后又逐渐增加，12 h 时出现第 2 个合成高峰，之后合成量逐步下降并趋于稳定。3~12 h 差异有统计学意义（$P<0.05$），12~24 h 差异无统计学意义（$P>0.05$）。

各相同时间段，变链两菌株生物膜状态合成水溶性及水不溶性葡聚糖能力不同，经统计学分析显示：3 ~ 20 h，593 号合成水溶性葡聚糖能力强于 18 号（$P<0.05$）；3 ~ 16 h，593号合成水不溶性葡聚糖能力强于 18 号（$P<0.05$），其他时间段差异无统计学意义（$P>0.05$）。

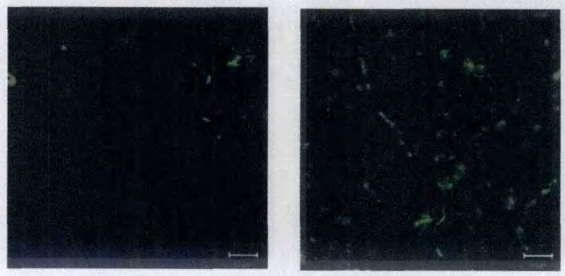
3 讨 论

牙菌斑生物膜主要由细菌及其分泌的胞外聚合物组成，其中最主要的胞外聚合物是胞外多糖。胞外多糖在菌斑生物膜这一微生态体系中形成一种有效的营养系统，网聚、浓缩来自外环境的重要矿物质和营养物质，利于细菌在载体表面的粘附以及细菌之间的集聚，维持生物膜的结构等[9]。以往对胞外多糖的研究多采用蒽酮法对其进行精确的定量分析，然而该法无法观察到多糖的具体分布情况。本研究利用FITC-ConA 荧光染料可与胞外多糖特异结合发出绿色荧光的特性，采用该染料染色生物膜中的胞外多糖，通过 CLSM进行断层扫描、成像、三维空间结构重建，可真实再现生物膜各时



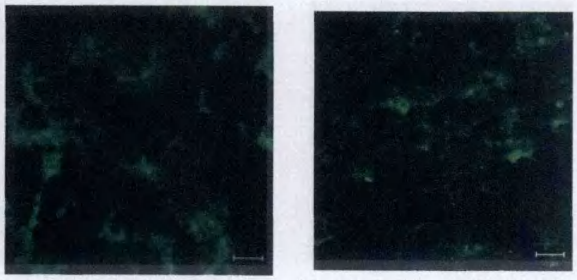
3 h 暗视野下见绿色荧光，呈小片状，不均匀稀疏分布，相互间有较大空隙（胞外多糖染色 CLSM 观察 10×20）

图 1 18 号（左图）、593 号（右图）临床株 3 h 生物膜



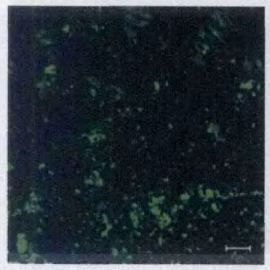
12 h 绿色荧光明显增多，呈团块状并相互连接，分布较广泛，相互间空隙减小，似地图状（胞外多糖染色 CLSM 观察 10×20）

图 2 18 号（左图）、593 号（右图）临床株 12 h 生物膜



20 h 绿色荧光基本充满整个视野，团块状相互融合呈复杂网络状结构，似云雾状棉絮状（胞外多糖染色 CLSM 观察 10×20）

图 3 18 号（左图）、593 号（右图）临床株 20 h 生物膜



高倍油镜下可清晰看到变链生物膜中绿色荧光呈团块状，或点状，颗粒状，其大小不一，形态各异，分布不均匀（胞外多糖染色 CLSM 油镜观察 10×63）

图 4 593 号临床株 20 h 生物膜

表 1 两临床株不同时间段生物膜各层胞外多糖密度（$\bar{x} \pm s$）

时间	外层		中间层		内层	
（h）	18 号	593 号	18 号	593 号	18 号	593 号
3	0.03 ± 0.08	0.08 ± 0.10*	0.20 ± 0.10	0.26 ± 0.10*	0.02 ± 0.04	0.06 ± 0.06*
12	0.19 ± 0.08	0.26 ± 0.09*	0.44 ± 0.09	0.59 ± 0.11*	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.02*
20	0.20 ± 0.10	0.27 ± 0.08*	0.49 ± 0.17	0.62 ± 0.11*	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.02*

注：* $P<0.05$，与 18 号临床株比较

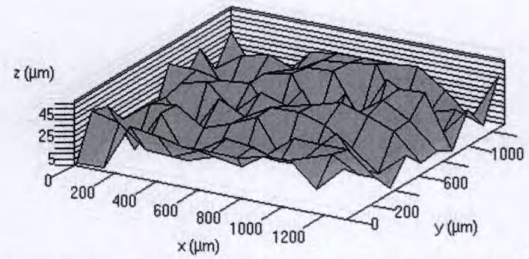


图 5　593 号临床株 20 h 生物膜胞外多糖分布的三维结构重建图

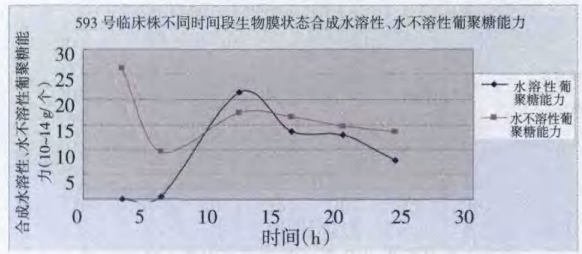


图 6　593 号临床株不同时间段生物膜状态合成水溶性、水不溶性葡聚糖能力变化趋势

表 2　两临床株不同时间段生物膜状态合成水溶性、水不溶性葡聚糖能力（单位：10~14 g/ 个）(n=6)　($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	水溶性葡聚糖		水不溶性葡聚糖	
	18 号	593 号	18 号	593 号
3	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.02*	18.31 ± 9.29	26.27 ± 9.12*
6	0.51 ± 0.02	0.87 ± 0.02*	5.29 ± 1.98	9.59 ± 2.16*
12	15.47 ± 9.21	21.35 ± 12.35*	13.95 ± 2.35	17.29 ± 2.78*
16	7.92 ± 3.98	13.58 ± 6.21*	12.98 ± 3.25	16.45 ± 3.47*
20	7.25 ± 2.98	12.91 ± 3.96*	14.12 ± 5.38	14.58 ± 4.57
24	6.98 ± 2.87	7.75 ± 2.98	13.13 ± 6.12	13.45 ± 4.79

注：* P<0.05，与 18 号临床株比较

间段胞外多糖的三维分布情况，再结合蒽酮法的定量分析，则可得到生物膜各时间段中胞外多糖的量和空间分布的整体信息，有助于进一步理解其功能。

CLSM 观察发现，在 3 ~ 20 h，生物膜中变链合成胞外多糖的量（绿色荧光面积）逐渐增加，从最初稀疏、片状的散在分布，此后片状相互融合形成团块状并相互连接，20 h 即形成几乎充满整个视野的致密复杂网络状结构。胞外多糖的量随时间增加的趋势与前期研究中观察到的生物膜中变链粘附量随时间增加的趋势一致，说明变链的数量与胞外多糖的量存在密切关系。然而二者谁为因谁为果尚无法从本研究得到答案：细胞外多糖，尤其是水不溶性葡聚糖，可高度促进变链在牙面的不可逆粘附、定植和聚集[2,9]，而变链可分泌细胞外多糖。究竟是由于变链数量的增多导致细胞外多糖分泌量的增加，还是由于细胞外多糖量的增加促进了变链的粘附和数量增多，或者互为因果？然而无论何种情况，本研究结果均提示胞外多糖可能是变链的粘附因子，其对于生物膜的发展、形成和成熟起着重要作用。

通过蒽酮法测定生物膜状态变链合成胞外多糖的量，发现 3 h 时合成水不溶性葡聚糖能力最强，这可能与生物膜形成早期需要大量水不溶性葡聚糖有关，因为水不溶性葡聚糖具有高生物稳定性、强粘性、不易被降解的特性，在细菌粘附过程中起重要作用，其在生物膜形成早期起到类似粘接剂的作用，因此可以推测合成水不溶性葡聚糖能力越强的菌株，其形成生物膜的能力越强[10]。此假设与我们的研究成果相吻合：593 号临床株的水不溶性葡聚糖合成能力和生物膜形成能力均明显强于 18 号临床株（P<0.05）。

胞外多糖的量在 12 ~ 24 h 趋于稳定，同时 CLSM 观察到 12 ~ 20 h 生物膜结构的内层和外层胞外多糖的密度较中间层为低，然而胞外多糖的密度并不是中心层最大，而是在内、外层之间有一个波动的起伏，这说明当生物膜结构基本形成后，胞外多糖分泌量也趋于稳定，此时其主要起着骨架作用：其非均质分布所形成的致密复杂网络状结构构成了生物膜细菌的支架，并维持菌斑基本结构的稳定。

CLSM 和蒽酮法的测定结果均显示：593 号临床株生物膜状态的合成能力均明显高于 18 号临床株（P<0.05）。提示合成胞外多糖能力的差异可能是导致菌株间致龋性差异的原因之一，而合成胞外多糖能力强的 593 号临床株的定植可能是导致宿主龋易感的原因之一。推测其原因可能是：593 号临床株可产生更多的高分子量、多分支、粘性的胞外多糖，所以其形成生物膜的能力更强，且其借助胞外多糖作为一种坚韧的三维支架形成的网络状生物膜结构更致密，生物膜厚度更大，生物膜结构更稳定，有助于其在应激环境中生存[11]和致龋，同时可使其免受外环境中一些不利因素，如抗生素、抗体、表面活性剂、细菌的吞噬和外来物的掠食等危害[12]。

同时，以上研究结果还提示可通过在生物膜形成的早期阶段（如前 3 h）抑制水不溶性葡聚糖的合成，从而减少变链生物膜的形成，并影响其质量，进而有可能减少变链的致龋机会，防止龋病的发生。

参 考 文 献

[1] 徐蓉蓉，葛剑平，胡　涛，等.不同生存状态下变形链球菌合成胞外多糖的研究[J].临床口腔医学杂志，2005，21(2)：79-81.

[2] Kuramitsu H K，Smorawinska M，Nakano Y J，et al.Analysis of glucan synthesis by *Streptococcus mutans*[J].Dev Biol Stand，1995，85(6)：303-307.

[3] 黄晓晶，刘天佳，陈国弟，等.变形链球菌（血清型 c）临床分离株 AP-PCR 基因分型[J].中华口腔医学杂志，2001，36(4)：281-284.

[4] 黄晓晶，刘天佳，陈　舟，等.高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究Ⅰ对唾液包被羟磷灰石的粘附实验[J].华西口腔医

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0285-05

用苹果辅助逆转大鼠肝纤维化的实验性研究

祝娟娟,程明亮,穆 茂
(贵阳医学院附属医院感染科,贵阳 550004)

【摘 要】目的:研究苹果对实验性肝纤维化大鼠的辅助逆转作用,并探讨其对肝纤维化的影响机制。方法:雄性 SD 大鼠 42 只分为正常组、CCl_4 肝纤维化模型组、自然恢复组、丹芍化纤治疗组、丹芍化纤 + 苹果试验组。除正常组以外,其余大鼠均采用 CCl_4、饮酒、高脂低蛋白饮食等复合因素刺激制备大鼠肝纤维化模型共 8 周。确认造模成功后再将剩余模型组大鼠随机分为丹芍化纤 + 苹果试验组、丹芍化纤治疗组及自然恢复组,共观察 8 周。结果:丹芍化纤 + 苹果试验组与模型组、自然恢复组及丹芍化纤治疗组比较:肝脏指数、血清 ALT 及 AST 显著下降($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.01$);RT-PCR 中核因子相关因子 2(NF-E2-related factor 2,Nrf-2)mRNA 及血红素加氧酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1) mRNA 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$),丹芍化纤 + 苹果试验组中肝组织 TGF-β1 的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组降低($P<0.05$)、而 MMP-2 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$);GSH 有所升高,MDA 有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:苹果在实验性肝纤维化大鼠的逆转过程中起到了有效的辅助作用,辅助逆转的机制可能与其上调 Nrf-2 表达,从而增强 HO-1 表达,增强其抗氧化功能,抑制脂质过氧化作用在丹芍化纤胶囊的治疗基础上进一步抑制了 TGF-β1 的表达;从而促进细胞外基质的降解,这可能是苹果辅助逆转肝纤维化的机制之一。

【关键词】苹果;丹芍化纤胶囊;肝纤维化;核因子相关因子 -2;血红素加氧酶 -1;转化生长因子 β1;基质金属蛋白酶;丙二醛;谷胱甘肽
【中国图书分类法分类号】R51 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-01

Adjuvant reverse effect of apple on liver fibrosis in rats

ZHU Juan-juan, et al
(*Department of Infection, the Affiliated Hospital, Guiyang Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the beneficial effects of apple as an adjuvant on liver fibrosis in rats and to explore its potential mechanisms. *Methods*: Forty-two SD rats were divided into the normal(n=10), fibrosis model control(n=8), Danshao Huaxian (DHC)(n=8), DHC plus Apple (n=8) and model (n=8) groups. Liver fibrosis model was induced by complex etiological factors, including CCl4, alcohol (every other day)and high lipid, low protein diets for eight weeks. After the establishment of liver fibrosis, model rats were treated with DHC and DHC plus Apple .The degree of liver fibrosis was examined under microscope. the liver index. *Results*: ALT and AST were significantly decreased in DHC plus Apple group($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). GSH of liver homogenate in DHC plus Apple group was significantly higher and MDA was lower than those in the DHC and model control groups ($P<0.05$). Hepatic mRNA expression of TGF-β1 was significantly decreased ($P<0.05$), while the expre-ssions of MMP-2 Nrf-2 and HO-1 were significantly increased compared to model control, DHC and Apple alone groups ($P<0.05$). *Conclusion*:

作者介绍:祝娟娟(1983-),女,硕士,
研究方向:肝纤维化的发生发展机制。
通信作者:程明亮,男,教授,Email:chengml@21cn.com。

学杂志,2000,18(6):416-418.
[5] 黄晓晶,刘天佳,杨锦波,等.高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究 Ⅱ 合成细胞外多糖能力的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2000,18(6):419-421.
[6] 黄晓晶,刘天佳,蔡志宇,等.不同龋敏感者变形链球菌临床分离株产酸能力的研究[J].四川大学学报(医学版),2004,35(4):520-521.
[7] 黄晓晶,刘天佳,蔡志宇,等.变形链球菌体外耐酸能力的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2004,14(8):427-429.
[8] 方会清,吴补领,苏凌云,等. 老年人高龋患者牙菌斑中变形链球菌临床分离株合成胞外多糖能力的研究[J].中华老年口腔医学杂志,2006,5(2):65-66.
[9] Tsumori H, Kuramitsu H.The role of the *Streptococcus mutans* gluco syltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: the essential role of the GtfC enzyme[J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(5):274-280.
[10] Mattos-Graner R O, Smith D J, King W F, et al.Water-insolu bleglucan synthesis by mutans Streptococcal strains correlateswith caries incidence in 12- to 30-month-old children[J]. J Dent Res, 2000, 79(6): 1371-1377.
[11] Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysac charide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms[J]. J Appl Microbiol, 2009, 4(2): 125-127.
[12] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J].Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.

(责任编辑:冉明会)