基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003848

# 介孔生物活性玻璃对牙菌斑生物膜组成及功能的调控作用研究

陈 雨，王雨霏，张凌琳

（口腔疾病防治全国重点实验室/国家口腔疾病临床医学研究中心/四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科，成都 610041）

**【摘 要】目的：**牙菌斑生物膜的组成与功能易受影响，可能引发各种口腔疾病。介孔生物活性玻璃（mesoporous bioactive glass，MBG）用途广泛，但其如何影响口腔牙菌斑生物膜组成及功能尚不清楚。本研究的目的在于探究MBG对体外牙菌斑生物膜中的活菌组成及生物功能的影响。**方法：**合成表征MBG，继而使用MBG短期处理体外牙菌斑生物膜，进行CFU计数评价其对生物膜生物量的影响。收集MBG处理后的牙菌斑样本进行宏转录组学研究，分析物种组成并筛选差异基因。最后通过RT-qPCR验证核心差异基因表达。**结果：**CFU计数结果显示MBG短期处理减少了44.25%的体外牙菌斑生物膜生物量；宏转录组结果显示MBG明显改变了牙菌斑生物膜的物种构成，共生链球菌及克雷伯菌为主要优势物种，并且主要上调其碳水化合物代谢功能，上调基因主要富集在三羧酸循环通路。RT-qPCR显示共有9个三羧酸循环基因表达增强。**结论：**本研究证实了MBG能显著改变体外牙菌斑生物膜的物种组成结构，增强体外牙菌斑生物膜的碳水化合物代谢，为MBG在口腔领域的应用提供了新的理论基础。

**【关键词】**牙菌斑；生物膜；纳米颗粒；宏转录组；三羧酸循环

**【中图分类号】**R781.1 **【文献标志码】**A

# Effects of mesoporous bioactive glass on the composition and function of dental plaque biofilm

*Chen Yu, Wang Yufei, Zhang Linglin*

(*State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Conservative Dentistry and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University*)

**【Abstract】*Objective*:** The composition and function of dental plaque biofilm are susceptible to alterations, potentially leading to various oral diseases. Although mesoporous bioactive glass (MBG) has been widely used, how it affects the microbial composition and biological function of dental plaque biofilm remains unclear. This study aims to investigate the effects of MBG on the composition and biological function of viable bacteria in dental plaque in vitro. ***Methods*:** At first, MBG was synthesized and characterized. Subsequently, the MBG was applied to dental plaque biofilm in vitro for a short term. The impact on biofilm biomass was assessed through colony-forming unit (CFU) counting. MBG-treated samples were collected for metatranscriptomic analyses of species composition and differentially expressed genes. Finally, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to validate the expression of core DEGs. ***Results*:** The results of CFU counting showed that short-term MBG treatment reduced dental plaque biofilm biomass in vitro by 44.25 %. The results of metatranscriptomics showed that MBG significantly changed the species composition of dental plaque biofilm, where commensal *Streptococci* and *Klebsiella* were predominant. The function of carbohydrate metabolism was up-regulated, and the up-regulated genes were mainly enriched in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. The results of RT-qPCR showed that a total of 9 genes associated with the TCA cycle were up-regulated. ***Conclusion*:** MBG can affect the species composition and enhance the carbohydrate metabolism of dental plaque biofilm in vitro, providing a new theoretical basis for the application of MBG in the oral field.

**【Key words】** dental plaque; biofilm; nanoparticle; metatranscriptome; tricarboxylic acid cycle

**作者介绍：**陈 雨，Email：chenyu_zzZ@outlook.com，研究方向：牙体硬组织修复及功能材料研究。

**通信作者：**张凌琳，Email：zhanglinglin@scu.edu.cn。

**基金项目：**国家自然科学基金青年科学基金资助项目（C类）（编号：82401095）；四川省科技计划资助项目（编号：2024YFHZ0008）。

**优先出版：**https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250421.1620.006（2025-04-22）

牙菌斑是一种复杂的生物膜，包括细胞外基质以及具有相互作用的多种微生物，并能维持一定的稳定性，在口腔健康中发挥着重要作用[1]。年龄、饮食、口腔卫生、全身免疫状态等因素均能影响牙菌斑内的微生物组成，若生物膜稳态被破坏，则会导致口腔疾病的发生[2]。龋病是最常见的口腔疾病之一，其发生发展是由复杂微生物群落而非单一致病菌引起，主要病因为大量碳水化合物的摄入及产酸细菌代谢活动的增加[3]。牙菌斑稳态失调还会引发牙龈炎及牙周炎，出现牙周复合体内牙齿支持组织的完整性丧失[4]。牙周微生物与牙周炎发生的关系复杂，公认的致病菌包括牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌等[5]，也有研究表明随着附着丧失和牙周袋的加深，牙周微生物群会因主要致病菌的占比增加而发生改变[6]。牙菌斑内的微生物群还会影响口腔肿瘤疾病，有研究显示在口腔癌组织中可以检测到梭杆菌属，且牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌的共培养可上调口腔鳞状细胞癌细胞中的炎症因子表达，虽然详细机制尚不清楚，但梭杆菌属已被证实与口腔癌中的细胞黏附、上皮间质转化、细胞周期改变等有关[7]。综上，牙菌斑生物膜的组成与功能易受影响，可能引发各种口腔疾病。

生物活性玻璃（bioactive glass，BG）具有良好的生物相容性、生物活性及可降解性，已被应用于口腔龋病防治及牙周治疗[8]。Lertwisitphon P 等[9]合成了添加 BG 的树脂封闭剂，增加了钙磷释放并碱化了细菌生长环境，表现出良好的细胞相容性并抑制变异链球菌生长，是一种前景广阔的龋病防治新材料。 Liu J 等[10]探究了掺锶 BG 的抗菌作用，发现随着锶含量的增加，BG 对牙龈卟啉单胞菌及伴放线杆菌的杀菌作用逐渐增强，实现了对牙周炎的潜在治疗效果。介孔生物活性玻璃（mesoporous bioactive glass，MBG）则是具有特殊介孔结构的 BG，与 BG 相比，MBG 的纹理及结构特性可以产生更优异的生物活性反应[11]。 Choi A 等[12]将 MBG 添加至自黏接树脂中，在提高物理性能及再矿化能力的同时，表现出对变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌的抗菌作用。Simila HO 等[13]结合硅酸钙水泥、胶原蛋白和 MBG 开发了一种新材料，不仅能维持对牙髓干细胞的生物安全和矿化诱导，还能显示出对粪肠球菌的抗菌作用。然而，MBG 作为一种应用未来广泛的口腔材料，如何影响口腔牙菌斑生物膜组成及功能尚不清楚，因而也就不清楚其长期应用将如何影响相关口腔疾病的发生发展。

宏转录组学是对某个微生物群落的整体转录组分析，提供了特定条件下活跃菌种的组成及活性基因的表达情况[14]，但由于其技术敏感度较高，在口腔领域与基因组技术相比应用较少。Edlund A 等[15]在 2018 年首次对体外牙菌斑生物膜的组装和成熟过程进行了宏转录组学分析，深入了解复杂口腔生物膜群落最初组装和成熟时的细菌行为和生态系统功能，对微生物群的动态功能反应和特有基因表达进行了量化对比，提供了 16S rRNA 测序和宏基因组学无法获知的关键生物学信息。Cho H 等[16]利用宏转录组学技术对 416 例学龄前儿童的龈上牙菌斑进行分析，以识别与龋病相关的种间相互作用，并在检测多种菌单独或与变异链球菌相互作用的生物膜形成动力学、空间排列及代谢活性的基础上，发现了一种作用未知的鞭毛厌氧菌，进一步验证了其在龋病中的致病机制。鉴于宏转录组学技术既能检测活菌组成功能、还能避免 PCR 假阳性偏差等技术特点，其在分析各类材料、药物对牙菌斑生物膜组成及功能的影响中具有不可替代的优势。

综上，本研究的目标为探究 MBG 对体外牙菌斑生物膜中的活菌组成及生物功能的影响。本研究首先通过微乳液辅助溶胶-凝胶法制备 MBG 并进行相关表征，进而培养体外牙菌斑衍生生物膜并进行 MBG 的短期处理，研究 MBG 对牙菌斑生物膜的抗菌作用，进一步采用宏转录组学技术分析 MBG 对体外牙菌斑生物膜模型中的活菌组成及生物功能的影响。本研究创新性发现 MBG 可如何影响牙菌斑组成，并影响了牙菌斑生物膜的哪些功能，首次从牙菌斑调控的角度为 MBG 的应用提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

十六烷基三甲基溴化铵（索莱宝，中国）、乙酸乙酯（阿拉丁，中国）、氨水（阿拉丁，中国）、硅酸乙酯（阿拉丁，中国）、四水硝酸钙（科隆，中国）用于 MBG 的制备。实验室用水均为去离子水（distilled deionized water，DDW）。SHI 培养基用于制备牙菌斑冻存样和培养牙菌斑来源的体外多菌种生物膜，其中含有 10 g/L 胨蛋白胨、5 g/L 胰解酪蛋白胨（BD Difco，美国）、5 g/L 酵母提取物（Oxoid，英国）、5 g/L 蔗糖，2.5 g/L 氯化钾、2.5 g/L 黏蛋白（Sigma-Aldrich，美国）、174 mg/L 精氨酸、60 mg/L 尿素、10 mg/L N-乙酰磷壁酸（Sigma-Aldrich，美国）、5 mg/L 氯化血红素、1 mg/L 维生素 K（百灵威，中国）和 50 mL/L 羊血（贝索，中国）。SHIS 用于牙菌斑衍生生物膜的培养，需在 SHI 培养基中再额外加入 0.5% 蔗糖。脑-心浸培养基（Oxoid，英国）；琼脂（BioFroxx，德国）及羊血用于血平板

的制备。

1.2 MBG的制备与表征

MBG的制备参考并改良自Zhou L等[17]的微乳液辅助溶胶-凝胶法。将2.80 g十六烷基三甲基溴化铵（cetyl trimethyl ammonium bromide，CTAB）溶解在132 mL DDW中，在35 ℃下搅拌30 min至CTAB完全溶解，然后加入40 mL乙酸乙酯（ethyl acetate，EA）搅拌30 min，再加入1 mol/L的氨水28 mL，搅拌混合物15 min后加入14.40 mL硅酸乙酯（tetraethyl orthosilicate，TEOS），并继续搅拌30 min，最后加入6.52 g四水硝酸钙（calcium nitrate，CN），搅拌4 h至溶液呈乳白色胶体。以10 000 r/min离心15 min收集胶体颗粒，用DDW和无水乙醇交替洗涤3次，收集的沉淀物在60 ℃下干燥12 h，并研磨成细粉，以2 ℃/min的加热速率加热至700 ℃煅烧3 h，以去除有机物和硝酸盐。

使用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM，SU3500，Hitachi，日本）和透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM，JEM-2100F，JEOL，日本）观察MBG的微观形貌，使用能谱仪（energy dispersive spectrometer，EDS，Aztec X-Max20，Oxford，英国）分析MBG的元素组成及各元素含量。测试前，取适量MBG粉末分散于1 mL无水乙醇中，超声处理1 min后混匀滴入镍网，自然干燥后在其表面喷金，以提高样品的导电性。在加速电压15 kV、真空模式下，使用SEM采集图像，随机选取3个视野进行EDS点分析，采集时间为60 s。在加速电压200 kV条件下，使用TEM采集图像，点分辨率为0.24 nm，线分辨率为0.14 nm。

将50 mg MBG粉末装入石英管，在80 ℃真空条件下脱气6 h以去除表面吸附物。使用全自动比表面积分析仪（brunauer-emmett-teller，BET，MicroActive for ASAP 2460，Micro，美国）测定MBG的介孔结构、比表面积及孔体积。BET测定在液氮温度-196 ℃下进行，相对压力（$P/P^{\circ}$）范围为0.005~1.000，孔径分布采用BJH法计算[18]。

1.3 体外牙菌斑生物膜模型的培养、MBG处理与菌斑计数

采集人牙菌斑，并制备牙菌斑冻存样[19]。选择5例22~24岁的健康无龋志愿者（经四川大学华西口腔医院伦理委员会审查，批件号：WCHSIRB-D-2024-108），取样前要求志愿者前一天晚上在九点刷牙后禁食禁饮，在取样当天早晨不进行口腔卫生清洁，取样当天早上9:00用无菌棉拭子擦取上下颌第一磨牙的龈上区域，并立即置于无菌磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）中，冰盒暂存。将牙菌斑样本转运至实验室后进行混样，并将1 mL的混合牙菌斑样本接种进10 mL的SHI培养基中，并在37 ℃厌氧条件下（85% $N_2$，10% $H_2$，5% $CO_2$）培养。24 h后将培养物离心（14 000 $g$，3 min），沉淀重悬于含有20%甘油的新鲜SHI培养基中并保存于-80 ℃冰箱制成牙菌斑冻存样，在整个实验过程中使用同一批冻存样进行生物膜的培养，以避免天然牙菌斑异质性的干扰。

取出牙菌斑冻存样进行牙菌斑生物膜的培养[19]。24孔板中每孔加入10 μL冻存牙菌斑和1 mL新鲜SHIS培养基，37 ℃厌氧培养24 h。待24 h生物膜形成后，吸尽上清，加入含有0.5 mg/mL MBG的SHI培养基1 mL，对照组只添加新鲜的SHI培养基，处理15 min。PBS洗涤2次，去除多余MBG，刮除处理后的孔底生物膜并收集至无菌EP管内，14 000 g离心5 min后去除上清，重悬至1 mL PBS，取500 μL生物膜混悬液，振荡混匀并10倍梯度稀释，进行血平板的细菌菌落计数[20]。另外500 μL生物膜混悬液去上清后保留菌体沉淀，液氮急冻后保存于-80 ℃冰箱，用于后续宏转录组分析[21]。本实验重复3轮。

1.4 宏转录组样本处理与测序分析

使用RNeasy Kits for RNA Purification试剂盒（Qiagen，德国）进行牙菌斑生物膜样品的RNA抽提。利用1%琼脂糖凝胶电泳和片段分析仪系统（Agilent5300，Agilent，美国）检测RNA的完整性。通过RiboCop rRNA清除试剂盒（Lexogen，USA）去除rRNA，获得mRNA。使用Illumina® Stranded mRNA Prep，Ligation（Illumina，美国）打断目标RNA，并令随机引物与mRNA互补，在逆转录酶的作用下，反转合成一链cDNA，随后进行二链合成，形成稳定的双链结构，对这些cDNA进行纯化、黏性末端修复及PCR扩增，获得cDNA文库。使用Illumina NovaSeq™ X Plus（Illumina，美国）进行测序。2组样本为平行混合测序，引入标签并进行数据清洗，通过拼接组装、ORF预测、聚类分析（参数为：95% identity、90% coverage）构建非冗余基因集。将优化数据与非冗余基因集进行比对，使用RSEM计算基因表达量TPM值（transcripts per million reads）。通过DESeq2对2组样品的TPM值进行比较，计算表达倍数值（fold change，FC），以筛选2组样品之间的显著差异表达基因（differential expressed genes，DEGs），筛选标准为Padjust<0.05且$|\log_2 FC| \geq 1$。利用NR数据库对非冗余基因集进行物种注释，在属和种的分类学水平上统计比较各物种在2组样本中的表达丰度，利用GO、KEGG及EggNOG数据库对DEGs进行功能注释及GO及KEGG通路富集分析。

1.5 DEGs的RT-qPCR验证

根据GO和KEGG富集结果选择关键DEGs进行RT-qPCR验证，对体外牙菌斑生物膜进行培养和MBG处理，收集离心后的菌体沉淀用于mRNA的提取。使用300 μL TRIzol®（Thermo Fisher Scientific，美国）处理菌体沉淀，快速上下震荡30 s后继续使用RNApure Bacteria试剂盒（康为世纪，中国）提取mRNA，使用PrimeScript™逆转录试剂盒（RR047A，Takara，日本）合成cDNA。使用Primer-BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）设计特异性引物（表1）。每25 μL PCR反应体系中含有12.5 μL SYBR® Premix Ex Taq TM Ⅱ（RR820A，Takara）、80 ng cDNA、1 μL正向引物和1 μL反向引物，引物浓度均为10 μmol/L。采用荧光定量PCR仪（LightCycler 480 Ⅱ，Roche，瑞士），进行80个循环的热循环（95 ℃反应5 s，60 ℃反应30 s）。以16S rRNA基因的转录水平为内参，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因表达的倍数变化。进行三轮重复实验。

1.6 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0统计分析软件对数据进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2组间比

表1 本研究特异性引物

| 基因 | 引物序列（正）5’→3’ | 引物序列（反）3’→5’ |
|---|---|---|
| *aceE* | TCCGTCCGCTGCTGGAAGAG | AGGTTGTTGGTGCTGTAAGAAGTCG |
| *aceF* | GGCGGTTGCTTCACTATCTCCAG | CATCACCAGGCGGCGAATGTC |
| *acnA* | TGGTGGTCGCCTACGCTCTG | GGTGAGATGTGGTCGGTGGTAAC |
| *acnB* | GACCTGCTGATTAACCGTGTACCG | CCTGCTTAGCGTGCTCGTTACC |
| *frdA* | CTCTTCCAGTCCTCCCTCCAGTTC | ATGCCGCCGTTGGTGTTATAGC |
| *frdB* | GGCATCAAGGTGGAGGCATTGG | GACAGGCGGCATAGCACAGC |
| *frdC* | TGACGACTAAACGCAAACCCTACG | ACAGGGCGACAAACAGAATCACTAC |
| *fumA* | GTTCCGCCGACCGCAACATC | GCCACGATAATAGTGCCGCTCAG |
| *gltA* | GGCACTCTCGGTCAGGATGTTATTG | ATCTGCTCGTGAATCATGGTGTGG |
| *icd* | CGCCGCCATCGAATACGCTATC | GCAATACCGATACCGCCAACCTG |
| *mdh* | ATCTTCATCCGATGTTGAGGTTCCG | CAATAGGCTGACGCTGCTCTACG |
| *nifJ* | CGCTCAGCCACGATCAGATGC | CACAGTTGCTCCGCCACTTCC |
| *pckA* | TGGCGATGATGAACACGGTTGG | CGTCGGCGGTCAGGAAGATAAC |
| *pdhB* | GCGTATTCCGTGCGACTGAAGG | TGATACCAGGCTGTTGTGCGATAAG |
| *pdhD* | CAACAATCTTCGCTCGCAGTAAACG | AGTGGTGTTGAGGTGTAAGCATCAC |
| *sdhA* | AAGGCTCGCTGGACCGTCTC | TGTTGAACTCGCTGGAAGTATCGTC |
| *sdhB* | TCCGTCCGCTGCCAGGATTAC | CGCTCGCTGGTTTCGGTATCG |
| *sucA* | TCATCAACGCATACCGCTTCCG | CCAATGGAGCCGCAATAGGTCTG |
| *sucB* | AGTGAAGGCGACACAGTAGAAGTTG | GCATATCGACGAGCAGAAGGTGTAG |
| *sucC* | GGTAAAGCGGGCGGTGTGAAG | CTTGTGGATCAGATGCGGAGTCTC |
| *sucD* | GATCGCTTACGGCACTCAGATGG | TCACTTTCACGGTCAGCATATCCAG |
| *16S rRNA* | AGAGATCTGGAGGAATACCG | TCCACGATTACTAGCGAT TC |

较使用*t*检验。宏转录组学的DEGs分析采用DESeq2，计算Padjust，GO通路及KEGG通路富集分析采用Fisher精确检验，检验水准$\alpha$=0.05。

## 2 结 果

### 2.1 MBG短期处理对24 h体外牙菌斑生物膜具有一定的清除作用

本研究合成的MBG呈均匀球形，粒径约（180 ± 15）nm（图1A），EDS结果显示Si和Ca的质量百分比约为43.58%、5.14%（图1B），符合纳米级MBG的尺寸及元素组成。如图1C所示，本研究合成的MBG孔道清晰、呈树枝状开放。BET测试表现出典型的Ⅳ型等温曲线且伴有回滞环，比表面积约为323.46 $m^2/g$，孔体积约为0.57 $cm^3/g$（图1D）。上述形貌、元素组成、介孔结构表征结果证实MBG合成成功。进一步地，血平板菌落计数结果（图1E）表明MBG组相对于Control组的细菌数量级下降了约0.26，进一步计算获得MBG短期处理对体外牙菌斑生物膜的清除率约为44.25%，与对照组比较差异有统计学意义（$t$=3.817，$P$=0.019），这提示MBG短期处理对24 h体外牙菌斑生物膜具有一定的清除作用。

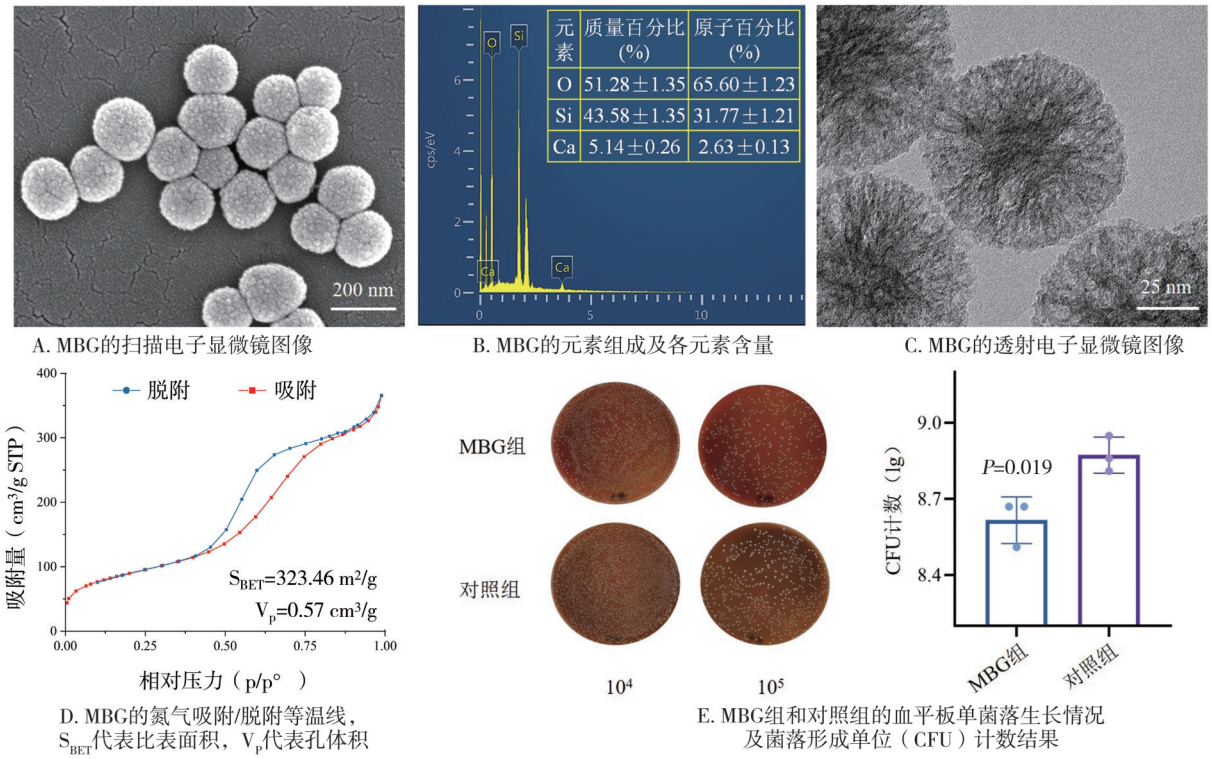
### 2.2 MBG显著改变了牙菌斑生物膜的物种组成结构

将非冗余基因集与NR数据库进行比对，通过NR库对应的分类学信息数据库获得物种注释结果，并使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度。如图2A所示，在属水平上，MBG组有21个独有菌属，占比约33.33%。在种水平上，MBG组有54个独有菌种，在总菌种中占比为30.17%（图2B）。利用PCoA图分析MBG组及Control组之间的样本相似性，结果如图2C所示，MBG组和Control组在种水平上的分离性较好，没有明显交叉，即2组的物种组成结构具有较大差异。

进一步分析2组的物种分布，并比较2组的物种丰度。如图3A所示，2组各样本在种水平上均以链球菌（*Streptococcus*）为主要优势菌种，占比约为80%以上，MBG组内样本异质性较对照组有所增加，MBG组内有2样本的鲍曼不动杆菌（*Acinetobaccter baumannii*）以及丰度低于1%的菌种明显增加。由菌种丰度均值气泡图所示（图3B），MBG组内的优势链球菌较对照组有所改变，MBG组内占比较高的链球菌包括HSISS2株链球菌（*Streptococcus sp.HSISS2*）、SR4株链球菌（*Streptococcus sp.SR4*）、多动物链球菌（*Streptococcus pluranimalium*）、嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）。此外，MBG组内的克雷伯菌属（*Klebsiella sp.*）、*A.baumannii*丰度明显提高。

### 2.3 MBG明显增强了牙菌斑生物膜的碳水化合物代谢

对比MBG组和Control组的功能基因表达情况，MBG组相较于Control组的上调基因有764个，下调基因有42个（图4A）。选取MBG组明显上调DEGs进行功能注释。COG功能注释显示有105个DEGs介导碳水化合物转运及代谢（carbohydrate transport and metabolism）（图4B）。KEGG功能注释（图4C）为类似结果，DEGs分布最多的通路为碳水化合物代谢（carbohydrate metabolism）。选取注释到碳水化合物代谢通路的276个DEGs进行进一步GO功能注释（图4D），结果显示DEGs分布最多的通路为有机酸代谢过程（organic

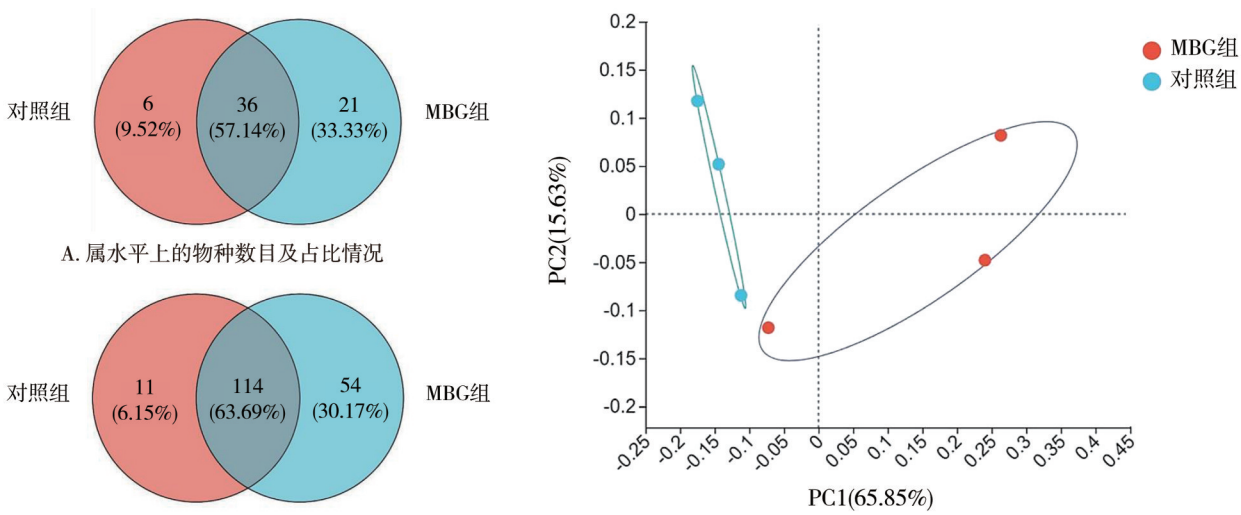



A. MBG的扫描电子显微镜图像　B. MBG的元素组成及各元素含量　C. MBG的透射电子显微镜图像

D. MBG的氮气吸附/脱附等温线，$S_{BET}$代表比表面积，$V_p$代表孔体积

E. MBG组和对照组的血平板单菌落生长情况及菌落形成单位（CFU）计数结果

**图1　MBG的结构表征及体外牙菌斑清除能力探究**




A. 属水平上的物种数目及占比情况

B. 种水平上的物种数目及占比情况

C. PCoA图显示2组在种水平上的β多样性，距离算法为binary jaccard

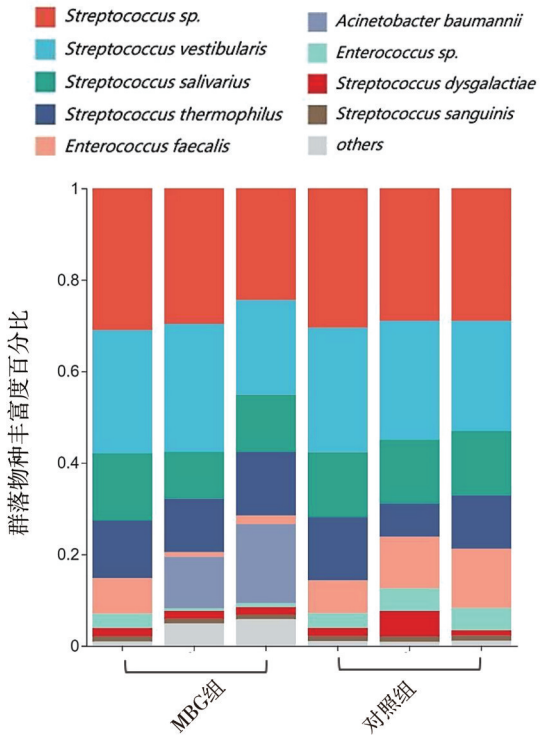
**图2　基于NR数据库的物种注释结果**

acid metabolic process）和碳水化合物代谢过程（carbohydrate metabolic process）。

MBG组上调DEGs的GO富集分析结果显示三羧酸循环（Tricarboxylic acid cycle）的富集比为0.92（$P_{adjust}$<0.001），富集程度最高（图5A）。KEGG富集结果如图5B所示，显著富集的前3位通路分别为三羧酸循环[TCA cycle，（$P_{adjust}$<0.001）]、甲烷代谢[methane metabolism，（$P_{adjust}$<0.001）]、原核生物中的碳固定途径[carbon fixation pathways in prokaryotes，（$P_{adjust}$<0.001）]。上述富集分析结果提示，MBG处理可能明显提高了牙菌斑生物膜的三羧酸循环功能，需要进一步验证。

### 2.4　MBG通过增强9个基因的表达，增强牙菌斑生物膜的三羧酸循环

绘制三羧酸循环通路图（图6A）以展示宏转录组学技术所鉴定到的上调节点，结果显示MBG组几乎上调了TCA循环的全部环节。进一步比较2组TCA循环基因的TPM值（图6B），结果显示共有21个关键基因上调，*ace*F和*pdh*B在MBG组和对照组中均明显表达，且MBG组中的表达量相对更高，其余基因在对照组中几乎不表达，在MBG组中表达更明显。针对这21个关键上调基因进行RT-qPCR验证，结果如图6C所示，共有9个基因在MBG组中表达增强，共同证实了MBG对牙菌斑生物膜的三羧酸循环中关键基因的上调作用。

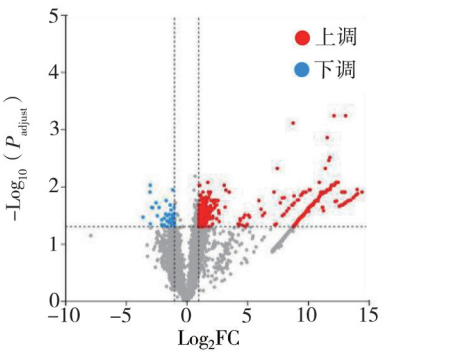



A. 2组物种丰度的堆叠柱状图，其中others指相对丰度小于1%的物种

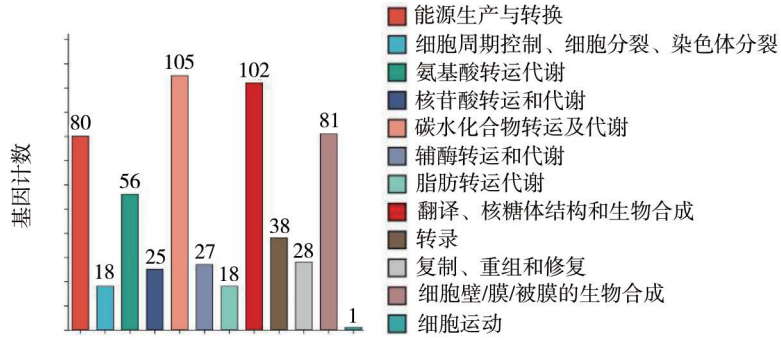



B. 2组物种丰度的气泡图，气泡的大小表示2组样本的菌种相对丰度均值

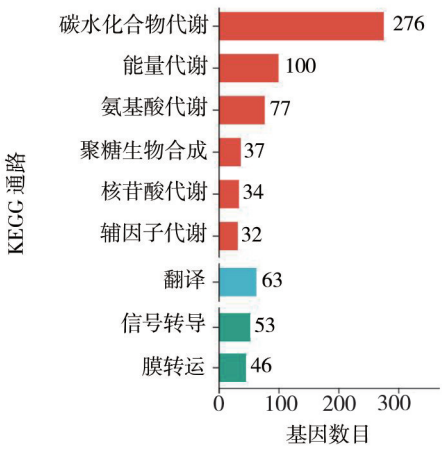
图3　基于NR数据库的物种丰度比较



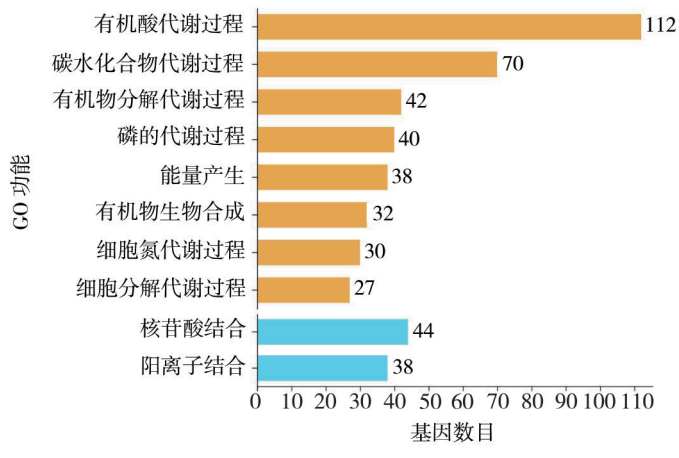

A. DEGs的火山图




B. 明显上调DEGs的COG功能注释

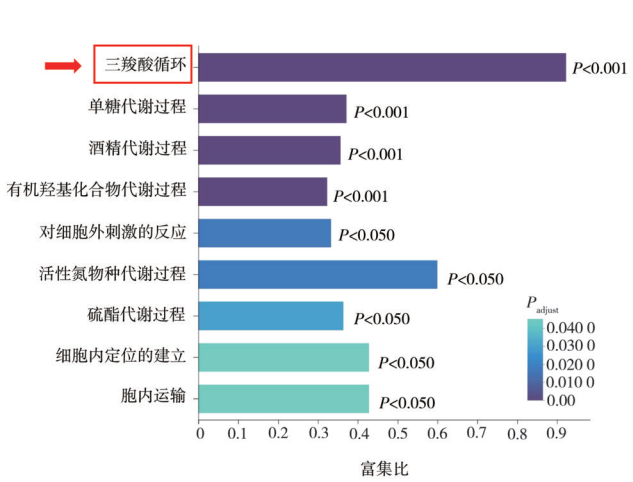



C. 明显上调DEGs的KEGG通路注释

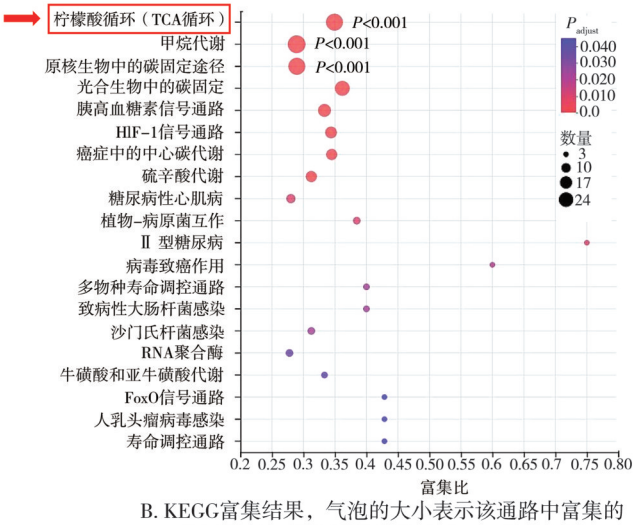



D. 分布至碳水化合物代谢通路的DEGs的GO功能注释

图4　MBG组和对照组的DEGs及功能注释结果

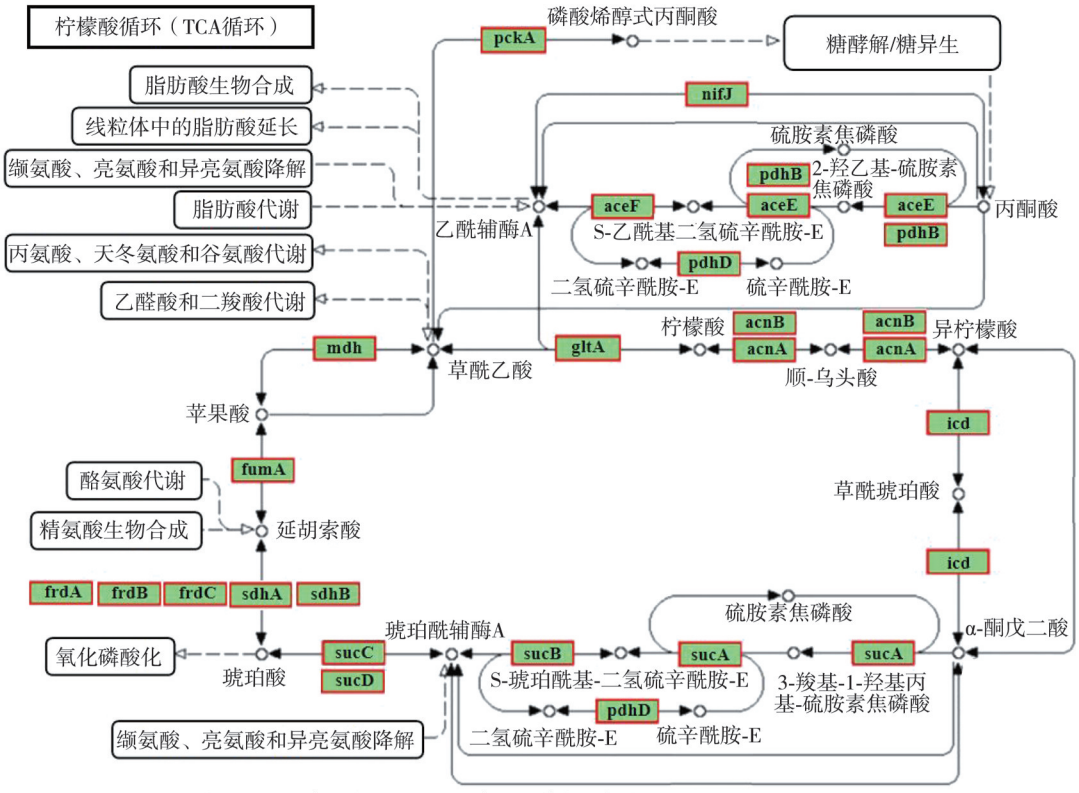



A. GO功能富集结果，富集比越大，表示富集的程度越大，颜色梯度变化显示$P_{adjust}$值的变化

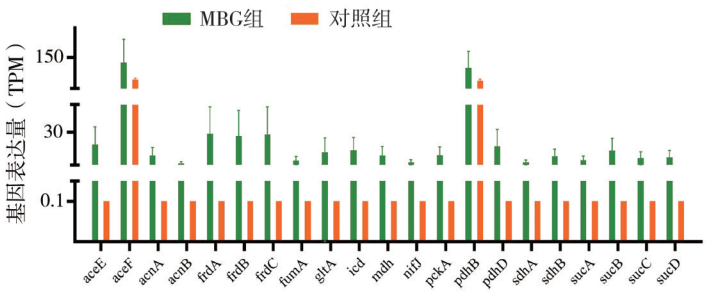



B. KEGG富集结果，气泡的大小表示该通路中富集的基因数量，颜色梯度变化显示$P_{adjust}$值的变化

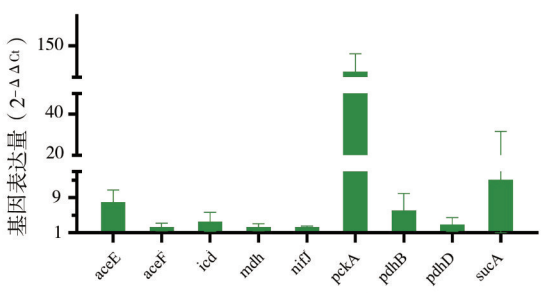
图5　MBG组上调DEGs的富集分析




A. 三羧酸循环通路图中的重要节点位置，其中绿框表示MBG组明显上调的DEGs




B. 2组在三羧酸循环通路中的上调基因TPM值




C. 通过RT-qPCR验证的MBG组三羧酸循环上调基因

图6　MBG对牙菌斑生物膜三羧酸循环通路的影响

## 3 讨 论

牙菌斑是一种由丰富细胞外基质和多种微生物构成的复杂生物膜，对多种口腔疾病的发生发展有显著影响[22]。BG是一种生物陶瓷，因其优异的生物相容性、抗菌性和生物活性被广泛用于口腔领域[23]。MBG不仅具有BG的性能优势，还能利用其独特的介孔结构递送各种活性分子和药物，在口腔领域表现出巨大的应用潜力[24]。因此，探究MBG对口腔牙菌斑组成和功能的影响，能为MBG对各类口腔疾病的潜在影响提供线索，继而为MBG在口腔领域的应用提供更多的理论基础。本研究首次探究MBG对牙菌斑生物膜组成及功能的影响，创新性利用宏转录组学技术发现MBG处理后样本的异质性有所增加，优势菌群包括多种共生链球菌、*Klebsiella sp.* 及 *A.baumannii*，并且碳水化合物代谢有所增强。共生链球菌可能通过产生过氧化氢或竞争黏附空间来抑制致龋菌的过度生长[25]，*Klebsiella sp* 及 *A. baumannii* 在牙周炎菌群样本中的比例可能较高[26]。上述结果提示应用MBG可能通过碱化牙菌斑生物膜，降低龋病发生的概率，但可能带来牙周疾病的风险。

本研究采用的体外牙菌斑生物膜模型主要基于Tian Y等[27]开发的SHI培养基，其中成分能支持口腔内多样化微生物群落的生长，且培养获得的微生物特征与原始口腔微生物群类似。该方法已得到广泛应用，例如Du Q等[28]通过该培养基建立了体外多菌种生物膜模型，证实了蔗糖对口腔微生物结构和组成的显著影响；Brar NK等[29]选用该培养建立人类口腔微生物组的离体生物膜模型，用于分析氨苄西林浓度对口腔微生物的影响。上述研究均证实了该培养基用于建立体外牙菌斑生物膜模型的合理性及有效性，这种方法培养的体外牙菌斑生物膜保持了人类口腔微生物群的物种丰富度和代谢多样性，是在体外可控条件下，研究各类因子对牙菌斑调控作用的理想模型。但体外实验难以完全模拟口腔复杂的生物环境（如唾液流动、微生物群落动态变化及免疫反应），尚需进一步的体内实验来反映生物系统的整体响应性。

本研究中MBG的短期处理对体外牙菌斑生物膜产生了一定的清除效果，其抗菌性可能与MBG的成分和微观结构有关，但目前尚无相关分子靶点的研究。MBG能够通过释放离子提高周围环境的pH，从而增加渗透压，当渗透压超过1%时，细菌会出现死亡[30]。纳米级的MBG还具有纳米颗粒的抗菌性质，可能扰乱细胞膜的静电相互作用，中断细胞呼吸、细胞分裂、DNA复制等。部分纳米级颗粒还可能穿透细胞，与细胞内结构和生物分子（如蛋白质、脂质、DNA等）相互作用，改变其结构和功能[31]。本研究发现牙菌斑中的副血链球菌（*Streptococcus parasanguinis*）、无乳链球菌（*S.agalactiae*）、血链球菌（*S.sanguinis*）、唾液链球菌（*S.salivarius*）、粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）等被MBG抑制，这些菌均为革兰氏阳性菌，其细胞壁由肽聚糖和磷壁酸组成，对MBG释放的碱性环境更敏感[32]。高pH会破坏肽聚糖的稳定性，导致细胞壁崩解，而其他口腔菌（如部分革兰氏阴性菌或耐碱性菌）可能通过外膜脂多糖或耐碱机制抵抗损伤[33]。其次，MBG组的优势链球菌（如 *S.sp.HSISS2*、*S.pluranimalium*、*S. thermophilus*）可能通过代谢产物抑制、资源竞争和免疫调节抑制其他菌种的生长，但对不同菌种的效果可能因环境条件和菌株特性而异[34]。而 *A. baumannii*、*Klebsiella sp* 还能产生铁载体，剥夺环境中的铁[35]，抑制其他细菌的生长。此外，MBG具有高比表面积，可以吸附并穿透生物膜胞外聚合物（extracellular polymeric substances，EPS），并释放钙离子促进EPS的分解，增加其通透性[36]。综上所述，MBG凭借其高表面积、释放离子并碱化微环境的特性，发挥其固有抗菌性及生物膜胞外基质渗透作用，从而部分清除牙菌斑生物膜，并且显著改变牙菌斑生物膜组成。

在功能研究方面，MBG增强了牙菌斑生物膜的TCA循环，其主要调控基因包括：*aceE*、*aceF*、*nifJ*、*pdhB*、*pdhD*、*icd*、*sucA*、*mdh*、*pckA* 等，这些基因的高表达将促进生物膜的能量供应。其中 *aceE*、*aceF*、*nifJ*、*pdhB*、*pdhD* 编码的酶共同影响的代谢途径是丙酮酸向乙酰辅酶A的转化，这是连接糖酵解和TCA循环的核心步骤，直接影响TCA循环的底物供应，进而决定细胞的能量代谢效率和生物合成能力[37]。*sucA* 通过编码α-酮戊二酸脱氢酶复合体E1亚基，在TCA循环中直接催化α-酮戊二酸转化为琥珀酰辅酶A，是循环中段的关键限速酶，对能量生成和代谢物供应至关重要[38]。*mdh* 编码苹果酸脱氢酶，负责催化苹果酸转化为草酰乙酸，是TCA循环的最后一步关键酶，影响TCA循环的持续运转和NADH的

生成[39]。链球菌单一存在时不具有完整的TCA循环基因[40]，但多种链球菌的协同互补可能发挥TCA循环的完整功能，即优势链球菌的存在可能额外增加了某些酶基因的表达，完善并上调了TCA循环。而克雷伯菌属的电子传递链能实现功能化的有氧呼吸，激活TCA循环并增加ATP产量[41]。因此，这些菌的增加会通过改变氧气利用，从而上调TCA循环。TCA循环的增强可能通过提高能量代谢效率、调节环境pH、提供生物合成前体及改变碳源利用模式[42]，选择性地促进需氧菌或兼性厌氧菌的生长，抑制厌氧菌的生长。这种代谢重编程可能降低牙菌斑的致病性，减少牙周炎及龋病的发生发展，但也可能因菌群结构改变引发其他口腔生态失衡。

本研究还可以通过荧光原位杂交结合共聚焦显微镜，验证关键菌群在牙菌斑中的空间分布，进一步分析其结构组成[43]。物种特异性定量PCR也可以检测宏转录组中具有显著性差异的菌种的丰度，但仅适用于验证少量目标菌[44]。而荧光底物法[45]和质谱法[46]可用于检测特定酶的活性，与宏转录组中的基因表达量进行对比，验证其功能机制。深入的代谢组学或蛋白组学分析也能验证宏转录组中预测的蛋白或代谢产物，与相关代谢通路的基因表达水平关联[47]。此外，同位素示踪实验可以将特定代谢通路的碳源底物标记，通过追踪同位素在代谢产物中的分布[48]，结合宏转录组数据分析菌群代谢的流向。综上，通过酶活性检测对目前筛选的酶基因在蛋白质表达层面进行更深入的验证，并利用同位素示踪实验追踪同位素在代谢产物中的分布，是一种潜在的机制研究方案。

本研究发现MBG能显著改变牙菌斑生物膜的物种组成结构，增强牙菌斑生物膜的碳水化合物代谢，为MBG在口腔领域的应用提供了新的理论基础。

## 参 考 文 献


[1] D'Elia G, Floris W, Marini L, et al. Methods for evaluating the effectiveness of home oral hygiene measures-a narrative review of dental biofilm indices[J]. Dent J (Basel), 2023, 11(7): 172.

[2] 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.

[3] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(12): 745-759.

[4] Łasica A, Golec P, Laskus A, et al. Periodontitis: etiology, conventional treatments, and emerging bacteriophage and predatory bacteria therapies[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1469414.

[5] Peng X, Cheng L, You Y, et al. Oral microbiota in human systematic diseases[J]. Int J Oral Sci, 2022, 14(1): 14.

[6] Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 511.

[7] Fujiwara N, Kitamura N, Yoshida K, et al. Involvement of *Fusobacterium* species in oral cancer progression: a literature review including other types of cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): E6207.

[8] Meskher H, Sharifianjazi F, Tavamaishvili K, et al. Limitations, challenges and prospective solutions for bioactive glasses-based nanocomposites for dental applications: a critical review[J]. J Dent, 2024, 150: 105331.

[9] Lertwisitphon P, Worapasphaiboon Y, Champakanan N, et al. Enhancing elemental release and antibacterial properties of resin-based dental sealants with calcium phosphate, bioactive glass, and polylysine [J]. BMC Oral Health, 2025, 25(1): 96.

[10] Liu J, Rawlinson SCF, Hill RG, et al. Strontium-substituted bioactive glasses *in vitro* osteogenic and antibacterial effects[J]. Dent Mater, 2016, 32(3): 412-422.

[11] Chen M, Wang YD, Yuan PY, et al. Multifunctional bioactive glass nanoparticles: surface - interface decoration and biomedical applications[J]. Regen Biomater, 2024, 11: rbe110.

[12] Choi A, Yoo KH, Yoon SY, et al. Anti-microbial and remineralizing properties of self-adhesive orthodontic resin containing mesoporous bioactive glass[J]. Materials (Basel), 2021, 14(13): 3550.

[13] Simila HO, Anselmi C, Cardoso LM, et al. Sol-gel-derived calcium silicate cement incorporating collagen and mesoporous bioglass nanoparticles for dental pulp therapy[J]. Dent Mater, 2024, 40(11): 1832-1842.

[14] Shakya M, Lo CC, Chain PSG. Advances and challenges in metatranscriptomic analysis[J]. Front Genet, 2019, 10: 904.

[15] Edlund A, Yang Y, Yooseph S, et al. Uncovering complex microbiome activities *via* metatranscriptomics during 24 hours of oral biofilm assembly and maturation[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 217.

[16] Cho H, Ren Z, Divaris K, et al. *Selenomonas* sputigena acts as a pathobiont mediating spatial structure and biofilm virulence in early childhood caries[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2919.

[17] Zhou L, Fan L, Zhang FM, et al. Hybrid gelatin/oxidized chondroitin sulfate hydrogels incorporating bioactive glass nanoparticles with enhanced mechanical properties, mineralization, and osteogenic differentiation[J]. Bioact Mater, 2021, 6(3): 890-904.

[18] Ilyas K, Singer L, Akhtar MA, et al. *Boswellia sacra* extract-loaded mesoporous bioactive glass nano particles: synthesis and biological effects[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(1): 126.

[19] Jiang W, Wang Y, Luo J, et al. Antimicrobial peptide GH12 prevents dental caries by regulating dental plaque microbiota[J]. Appl Environ Microbiol, 2020, 86(14): e00527-20.

[20] Souza MA, Corralo DJ, Gabrielli ES, et al. Oral bacterial decontamination using an innovative prototype for photocatalytic disinfection [J]. Clin Oral Investig, 2022, 26(3): 3005-3010.

[21] Dame-Teixeira N, El-Gendy R, de Oliveira AS, et al. Engineering a dysbiotic biofilm model for testing root caries interventions through microbial modulation[J]. Microbiome, 2024, 12(1): 145.

[22] Serrage HJ, Jepson MA, Rostami N, et al. Understanding the matrix: the role of extracellular DNA in oral biofilms[J]. Front Oral Health, 2021, 2: 640129.

[23] Skallevold HE, Rokaya D, Khurshid Z, et al. Bioactive glass applications in dentistry[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): E5960.

[24] Cui Y, Hong SB, Jiang WD, et al. Engineering mesoporous bioactive glasses for emerging stimuli-responsive drug delivery and theranostic applications[J]. Bioact Mater, 2024, 34: 436-462.

[25] Ye D, Liu Y, Li J, et al. Competitive dynamics and balance between *Streptococcus mutans* and commensal streptococci in oral microecology[J]. Crit Rev Microbiol, 2025, 51(3): 532-543.

[26] Kiari FZ, Meddah B, Tir Touil Meddah A. *In vitro* study on the activity of essential oil and methanolic extract from Algerian *Nigella sativa* L. Seeds on the growth kinetics of micro-organisms isolated from the buccal cavities of periodontal patients[J]. Saudi Dent J, 2018, 30(4): 312-323.

[27] Tian Y, He X, Torralba M, et al. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities[J]. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(5): 357-367.

[28] Du Q, Fu M, Zhou Y, et al. Sucrose promotes caries progression by disrupting the microecological balance in oral biofilms: an *in vitro* study[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2961.

[29] Brar NK, Dhariwal A, Åmdal HA, et al. Exploring *ex vivo* biofilm dynamics: consequences of low ampicillin concentrations on the human oral microbiome[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2024, 10(1): 37.

[30] Drago L, Toscano M, Bottagisio M. Recent evidence on bioactive glass antimicrobial and antibiofilm activity: a mini-review[J]. Materials (Basel), 2018, 11(2): E326.

[31] Capuano N, Amato A, Dell'Annunziata F, et al. Nanoparticles and their antibacterial application in endodontics[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(12): 1690.

[32] Jeong GJ, Khan F, Tabassum N, et al. Controlling biofilm and virulence properties of Gram-positive bacteria by targeting wall teichoic acid and lipoteichoic acid[J]. Int J Antimicrob Agents, 2023, 62(4): 106941.

[33] Ruhal R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria[J]. Microbiol Res, 2021, 251: 126829.

[34] Choi A, Dong K, Williams E, et al. Human saliva modifies growth, biofilm architecture, and competitive behaviors of oral streptococci[J]. mSphere, 2024, 9(2): e0077123.

[35] Semenec L, Cain AK, Dawson CJ, et al. Cross-protection and cross-feeding between *Klebsiella* pneumoniae and *Acinetobacter* baumannii promotes their co-existence[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 702.

[36] Wang J, Lou Y, Feng K, et al. Enhancing the decomposition of extracellular polymeric substances and the recovery of short-chain fatty acids from waste activated sludge: Analysis of the performance and mechanism of co-treatment by free nitrous acid and calcium peroxide [J]. J Hazard Mater, 2022, 423: 127022.

[37] Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(3): 475-478.

[38] Ainelo A, Porosk R, Kilk K, et al. *Pseudomonas putida* responds to the toxin GraT by inducing ribosome biogenesis factors and repressing TCA cycle enzymes[J]. Toxins (Basel), 2019, 11(2): E103.

[39] Springer AL, Agrawal S, Chang EP. Malate dehydrogenase in parasitic protozoans: roles in metabolism and potential therapeutic applications[J]. Essays Biochem, 2024, 68(2): 235-251.

[40] Andreassen PR, Trappetti C, Minhas V, et al. Host-glycan metabolism is regulated by a species-conserved two-component system in *Streptococcus* pneumoniae[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(3): e1008332.

[41] Hussein M, Allobawi R, Zhao J, et al. Integrated transcriptomic and metabolomic mapping reveals the mechanism of action of ceftazidime/avibactam against pan-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. ACS Infect Dis, 2023, 9(12): 2409-2422.

[42] Wu Z, Liang X, Li M, et al. Advances in the optimization of central carbon metabolism in metabolic engineering[J]. Microb Cell Fact, 2023, 22(1): 76.

[43] Grodner B, Shi H, Farchione O, et al. Spatial mapping of mobile genetic elements and their bacterial hosts in complex microbiomes[J]. Nat Microbiol, 2024, 9(9): 2262-2277.

[44] Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, et al. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals[J]. Clin Oral Investig, 2021, 25(6): 3535-3542.

[45] Ciuffreda P, Xynomilakis O, Casati S, et al. Fluorescence-based enzyme activity assay: ascertaining the activity and inhibition of endocannabinoid hydrolytic enzymes[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7693.

[46] Šebela M. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in enzyme activity assays and its position in the context of other available methods[J]. Mass Spectrom Rev, 2023, 42(3): 1008-1031.

[47] Chetty A, Blekhman R. Multi-omic approaches for host-microbiome data integration[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2297860.

[48] Bartman CR, Faubert B, Rabinowitz JD, et al. Metabolic pathway analysis using stable isotopes in patients with cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(12): 863-878.

（收稿：2025-02-25；修回：2025-03-11；录用：2025-03-14）

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

陈 雨，王雨霏，张凌琳. 介孔生物活性玻璃对牙菌斑生物膜组成及功能的调控作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(9)：1261-1270.