



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：后生元牙膏及牙膏中的 SLS 对口腔生物膜抗龋性的影响
作者：高静, 孙莲莲, 师庆英, 黄正梅, 路福平, 赵化冰
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240033
网络首发日期: 2024-11-08
引用格式: 高静, 孙莲莲, 师庆英, 黄正梅, 路福平, 赵化冰. 后生元牙膏及牙膏中的 SLS 对口腔生物膜抗龋性的影响[J/OL]. 天津科技大学学报. <https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20240033>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240033

后生元牙膏及牙膏中的 SLS 对口腔生物膜抗龋性的影响

高静¹, 孙莲莲⁴, 师庆英^{1,2}, 黄正梅³, 路福平^{1,2}, 赵化冰^{1,2}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457;
3. 山东本真化妆品有限公司天科本真人微生态研究院, 天津 300457; 4. 北京大学滨海医院口腔科, 天津 300450)

摘要: 通过构建体外口腔微观世界模型, 运用结晶紫染色法、总菌落形成单位 (CFU) 计数法、聚合酶链式反应 (PCR) 技术、乳酸浓度测定和 16S rDNA 测序等方法, 探究了后生元牙膏及牙膏中的十二烷基硫酸钠 (SLS) 对口腔生物膜抗龋性的影响。结果表明, 后生元牙膏 (PT) 干预能够维持健康生物膜的正常生长和代谢, 致龋挑战后, PT 组生物膜活菌数、细菌总量和代谢活性均较低, 抗龋性好。SLS 能够破坏健康生物膜的生长、代谢和三维网状结构, 致龋挑战后, SLS 组生物膜的生物量、活菌数、细菌总量和代谢活性升高, 龋病的发生风险升高。生物膜群落分析发现, PT 组 α 多样性和菌群结构均与阴性 (超纯水) 对照组接近, 且在致龋挑战后保持较好的稳定性。SLS 组具有较高的 α 多样性, 但是其菌群结构失调, 且不稳定。PT 和 SLS 联合干预组的结果显示, 由于 PT 能够有效对抗 SLS 对生物膜的破坏作用, 因此后生元牙膏中的 SLS 并不足以引起口腔微生态失调。本研究可为口腔护理产品有效成分的开发提供参考。

关键词: 后生元牙膏; 十二烷基硫酸钠; 口腔微生态; 生物膜; 龋病

中图分类号: R780.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(0000)00-0000-00

Effect of Postbiotic Toothpaste and SLS in Toothpaste on the Caries Resistance of Oral Biofilm

GAO Jing¹, SUN Lianlian⁴, SHI Qingying^{1,2}, HUANG Zhengmei³, LU Fuping^{1,2}, ZHAO Huabing^{1,2}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 3. Tianke & Benzhen Human Microecology Research Institute, Shandong Benzhen Cosmetics Company Limited, Tianjin 300457, China; 4. Department of Stomatology, Peking University Binhai Hospital, Tianjin 300450, China)

Abstract: In this study, an *in vitro* model of the oral microbiome was constructed to investigate the effect of postbiotic toothpaste and sodium dodecyl sulfate (SLS) in toothpaste on the caries resistance of oral biofilm using crystal violet staining, total colony-forming unit (CFU) counting, polymerase chain reaction (PCR) analysis, lactic acid concentration determination and 16S rDNA sequencing. The results showed that the postbiotic toothpaste (PT) was able to maintain the normal growth and metabolism of healthy biofilms, and after the cariogenic challenge, the number of living bacteria, total bacterial load, and metabolic activity were lower in the PT group, which was better for caries resistance. SLS is capable of disrupting the growth, metabolism, and three-dimensional structure of healthy biofilms, and after cariogenic challenge, the biomass, viable bacterial counts, total bacterial load, and metabolic activity of the biofilms in the SLS group were elevated, and the risk of caries development was elevated. Biofilm community analysis revealed that both α -diversity and community structure of the PT group were close to those of the negative control group and remained relatively stable after cariogenic challenge. The SLS group had high α -diversity, but its flora structure was dysregulated and unstable. The results of the combined PT and SLS intervention group showed that the SLS in the postbiotic toothpaste was not sufficient to cause oral microecological dysregulation because PT was effective in counteracting the destructive effect of SLS on biofilm. This study may provide a reference for the development of effective ingredients for oral care products.

Key words: postbiotic toothpaste; SLS; oral microecology; biofilm; dental caries

口腔是一个复杂的微生态系统, 其微生物组成 包括细菌、真菌、噬菌体、病毒、古细菌和原生动

物等^[1]。口腔微生物群是人体微生物区系的重要组成部分，在人体健康中发挥着重大作用。口腔微生物之间的协同作用和相互作用有助于人体抵御外界的不良刺激。口腔微生物群的失衡可导致口腔疾病和全身系统性疾病^[2-4]。

龋病 (dental caries) 是一种常见的细菌感染性口腔疾病，其患病率高、危害范围广，已被世界卫生组织列为继癌症、心血管疾病之后的第三大慢性非传染性疾病^[5]。第四次中国口腔健康流行病学调查报告显示，儿童和成人龋齿发病率均呈上升趋势，35~44 岁患龋率高达 89%^[6]。附着在牙釉质表面的复杂微生物群落构成的聚集体^[7]，称为牙菌斑 (dental plaque) 生物膜。宿主、细菌、食物和环境等多种因素均会导致龋病的发生，特别是游离糖的摄入，使得牙菌斑生物膜由生理性结构转变为病理性结构，变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 等产酸微生物丰度上升，导致牙齿脱矿，有机成分崩解，从而引起龋病的发生^[8]。因此，拮抗病理性生物膜的形成是防治龋齿的重要途径。

目前预防龋病的临床研究涉及很多方面，如氟化物防龋、窝沟封闭、预防性充填、抗生素防龋和免疫防龋等，但这些措施都存在不同程度的局限性，难以广泛、及早的实施，而且部分措施对口腔微生态存在一定负面影响。针对龋病的防治应更加注重临床前段的日常口腔护理，例如使用牙膏刷牙和使用益生菌制品等。

近几年，后生元制剂作为新型生物化合物在改善口腔健康方面的应用正日益引起人们的兴趣。2021 年，国际益生菌和益生元科学联合会 (International Scientific Association For Probiotics And Prebiotics, ISAPP) 发布共识声明，将后生元定义为“对宿主健康有益的无生命微生物和/或其成分的制剂”^[9]。与益生菌相比，后生元具有更好的安全性，在制备、存储、运输等方面也更具优势，更适合添加在牙膏等日常口腔护理用品中。Basir 等^[10]研究表明后生元牙膏能有效提高口腔免疫力，可用于预防龋齿等口腔疾病。另一研究表明，后生元含片可促进失衡菌群向健康菌群转变来调节龋病充填治疗后的口腔菌群，从而改善龋病患者的预后^[11]。Di 等^[12]发现益生菌唾液链球菌 M18 (*Streptococcus alivarius* M18) 释放的细菌素可有效拮抗牙菌斑。因此，后生元能够通过控制口腔有害微生物，恢复菌群平衡，从而达到预防龋齿发生的目的^[13]。

表面活性剂是一种广泛添加的牙膏成分，主要用于清洁和起泡作用，并使牙膏中的成分均匀分

布，其使用浓度通常在 1%~2% 之间。其中，十二烷基硫酸钠 (sodium lauryl sulfate, SLS) 最为常用。有研究表明，SLS 能够抑制口腔菌群分泌乳酸和形成胞外多糖^[14,15]，在预防龋齿方面发挥正向作用；但同时 SLS 也具有一定的抑菌性，主要是由于 SLS 能够与细菌的细胞壁和细胞膜相互作用，增强细胞的通透性，导致细胞内成分的泄漏和细胞溶解^[16]。因此，SLS 作为一种非特异性杀菌剂^[14]，可能是影响口微生态的潜在风险物质。

在本研究中，我们通过构建健康和致龋体外口腔微观世界模型，探讨后生元牙膏及牙膏中的 SLS 对口腔微生态和龋齿的影响，为牙膏配方成分的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

1% 结晶紫染色液、无菌抗凝羊血，北京索莱宝科技有限公司；FastDNA® SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 生物医学公司；乳酸 (LD) 测试盒，南京建成生物科技有限公司；胰蛋白胍大豆琼脂 (TSA)，北京奥博星公司；十二烷基硫酸钠 (SLS)、葡萄糖酸氯己定 (CHX)，上海麦克林生化科技有限公司；后生元牙膏 (含 20% *Lactobacilli* sp.BZ 发酵提取物、磷酸二氢钙、甘油、水、纤维素、果胶、黄原胶、结冷胶、凝乳胶、琼脂)、含 1.8% (v/v) SLS 的后生元牙膏，山东本真化妆品有限公司。

冷冻离心机，美国 Thermo 公司；多功能酶标仪，Molecular Devices；PCR 基因扩增仪，德国 Eppendorf 公司；实时荧光定量 PCR 仪，美国 ABI 公司；超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；核酸蛋白测定仪，Bio-Rad Laboratorie 公司；TU-1810 型紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；888-SIMPLICITY-全自动厌氧箱，美国 Plas-Labs 公司。

1.2 方法

1.2.1 口腔生物膜模型的构建

招募年龄在 21-26 岁的 5 名健康受试者 (男 2 名，女 3 名) 进行唾液样品采集。招募的受试者无口腔和全身疾病 (高血压，糖尿病，心脏病等)，受试前 3 个月内未使用抗生素和专业牙科预防药物。受试者在样品收集前 24 h 内不做任何口腔清洁，采样前 2 h 内不进食任何食物和饮料。每个受试者收集唾液样品 10 mL，在 4°C 条件下 2,600xg 离

心 10 min, 去除口腔组织碎片和真核细胞, 上清液为所得唾液样品, -80°C保存。

本研究使用的阿姆斯特丹主动附着模型 (Amsterdam Active Attachment Model, AAA Model), 购自荷兰阿姆斯特丹牙科学术中心 (Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam, ATCA)。AAA模型由一个定制的不锈钢盖子和 24 孔培养板组成, 盖子上固定 24 个尼龙夹子, 夹子上夹有 10 mm 的玻璃爬片, 将装有玻璃爬片的盖子倒置在聚苯乙烯 24 孔培养板中, 用于生物膜的培养^[17]。

根据 Tian 等人研究^[18], 采用 SHI 培养基培养生物膜。接种培养基按照唾液: 培养基等于 1: 50 的比例配置。然后, 在 24 孔板中每孔加入 1.5 mL 接种培养基, 将 AAA 模型的盖子转移到 24 孔板中, 确保玻璃盖玻片基质的位置与每孔完全对应。在厌氧箱中, 37°C 厌氧条件下 (85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) 培养 8 h, 使生物膜在玻璃盖玻片上进行初始附着以构建生物膜模型。

生物膜在初始附着后转移到新的 SHI 培养基中培养 12 h, 然后使用 PBS 润洗 3 次。本实验设置 5 个处理组: 超纯水 (CTL) 为阴性对照组; 0.12% (v/v) 葡萄糖酸氯己定 (CHX) 为阳性对照组; 25% (v/v) 后生元牙膏 (PT)、含 1.8% (v/v) SLS 的 25% (v/v) 后生元牙膏 (PT+SLS)、1.8% (v/v) 十二烷基硫酸钠 (SLS) 为实验组。各处理组的生物膜每 12 h 处理一次, 每次持续 2 min, 并使用 PBS 润洗 3 次, 以模拟人类日常刷牙过程。各处理组的生物膜在 37°C 厌氧箱中继续培养 48 h 至生物膜成熟后, 收获部分生物膜 (n=3) 作为健康生物膜用于后续的定量和定性分析。

剩余生物膜转移至含有 2% 蔗糖浓度的 SHI 培养基中继续培养 3 d, 进行致龋环境挑战, 过程中每天清洗生物膜并更新培养基 2 次, 最后收集各处理组的生物膜 (n=3) 作为致龋生物膜用于后续分析。

1.2.2 生物膜生物量测定

采用结晶紫染色法 (crystal violet staining, CV 法) 测定生物膜的形成量。用 PBS 冲洗生物膜 3 次后, 室温下使用 500 μL 0.1% 结晶紫染色 20 min, 并用 PBS 洗去过量的未结合染料。然后, 使用 95% 乙醇对生物膜进行脱色 30 min, 轻摇至生物膜中无结晶紫释放。将洗脱液溶液转移到 96 孔板中, 使用酶标仪测定 595 nm 处的 OD 值。

1.2.3 菌落形成单位测定

将生物膜收集在含有 2 mL 无菌 PBS 的 EP 管中, 使用涡旋混合器震荡获得分散均匀的细菌悬液。将 50 μL 细菌悬液进行梯度稀释后, 涂布在胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 血板上, 37°C 厌氧培养 7 d, 计数总菌落形成单位 (colony forming unit, CFU)。

1.2.4 定量 PCR 分析

根据试剂盒使用说明书要求, 利用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒提取生物膜样品的 DNA。使用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μL): 2×TB Green Premix Ex Taq II (10 μL)、上下游引物 (10 μmol/L) (各 0.8 μL)、ROX (0.4 μL)、DNA 模板 (2 μL) 和 ddH₂O (6 μL)。PCR 反应程序: 95°C 30 s, 95°C 5 s, 57°C 20 s, 75°C 30 s, 40 个循环。循环结束后 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s, 建立溶解曲线。每个样本重复 3 次, 反应结束后, 记录 Ct 值, 采用绝对定量的方法进行分析。

1.2.5 乳酸含量测定

将不同处理后的生物膜用 PBS 冲洗后转移到新的 24 孔板中, 每孔添加 1.5 mL 含 9 g/L 葡萄糖但不含酵母提取物和蔗糖的 SHI 培养基。生物膜在 37°C 下厌氧培养 1 h, 采用乳酸测试盒测定培养基中的乳酸含量。

1.2.6 扫描电镜形态学观察

将生物膜用 PBS 冲洗 3 次, 转移到新的 24 孔板中, 每孔加入 1.5 mL 2.5% 戊二醛, 在 4°C 下保存过夜。然后, 以酒精梯度 (50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%) 依次脱水 10 min, 室温干燥。样品喷射涂金后, 用扫描电镜 (SEM) 观察生物膜。

1.2.7 16S rDNA 测序分析

16S rDNA 基因测序部分由上海美吉生物医药科技有限公司执行, 主要测序实验过程如下: 取口腔生物膜 DNA 样品及对应融合引物配置聚合酶链式反应体系, 进行 PCR 扩增, 建立数据库。使用 Illumina MiSeq 平台对 16S rDNA 的 V3-V4 区域进行测序, 并对结果进行过滤, 将高质量的 Clean data 用于后期数据分析。通过 reads 之间的重叠关系将其拼接成 Tags, 将 Tags 聚类成操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU), 然后与 Greengenes 和 RDP 数据库进行比对和物种注释。基于上述测序结果进行后续样品物种复杂度分析和组

间物种差异分析等。

1.2.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据统计处理, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较各组数据的差异值, 数据用均数±标准差 (mean±SD) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

基于 AAA 装置, 我们成功构建了体外口腔微观世界生物膜模型。采用超纯水 (CTL)、0.12% (v/v) 葡萄糖酸氯己定 (CHX)、25% (v/v) 后生元牙膏 (PT)、含 1.8% (v/v) SLS 的 25% (v/v) 后生元牙膏 (PT+SLS)、1.8% (v/v) 十二烷基硫酸钠 (SLS) 对生物膜模型, 通过模拟人类日常刷牙的方式进行干预。48 h 之后收获部分生物膜, 其余生物膜在含有 2% 蔗糖的 SHI 培养基中进行蔗糖致龋挑战, 继续培养 3 d 后收获。在收获生物膜后, 测定了生物量、CFU、细菌总量、产酸代谢, 生物膜形貌结构和微生物群落结构, 旨在从多角度探究不同干预方式对生物膜及其抗龋性的影响。

2.1 生物膜生物量测定

通过结晶紫染色法测定生物膜生物量。如图 1A 所示, 在健康生物膜模型中, PT 组与 CTL 组生物量无显著差异 ($P > 0.05$), SLS 组生物量显著低于 CTL 和 PT 组 ($P < 0.05$); 经致龋挑战后 (图 1B), 由于培养基中蔗糖的作用, 所有组别生物量均上升, PT 组生物膜生物量与 CTL 组无显著差异 ($P > 0.05$), 而 SLS 处理组的生物量低于 CTL 组和 PT 组 ($P < 0.05$); 无论是在健康生物膜还是致龋生物膜中, PT+SLS 组的生物量均位于 PT 和 SLS 组之间。由此可见, 后生元牙膏干预对生物膜生物量没有显著的影响; SLS 对生物膜生物量具有一定的抑制作用。

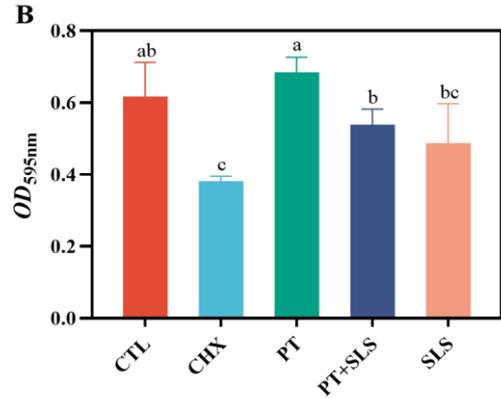
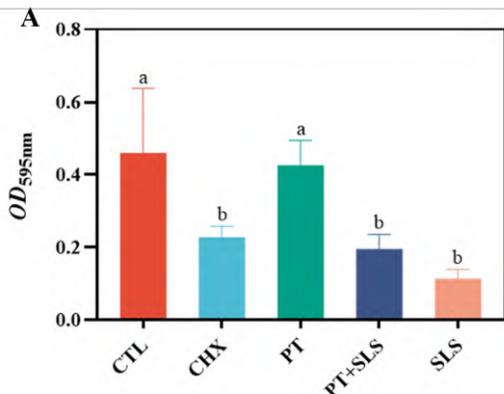


图 1 后生元牙膏及 SLS 对生物膜生物量的影响

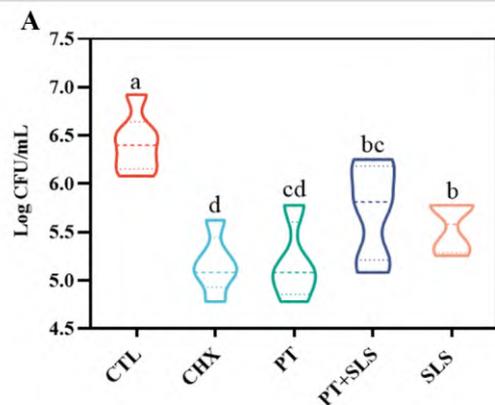
Fig. 1 Effects of postbiotic toothpaste and SLS on biofilm biomass

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。

A. 健康生物膜生物量; B. 致龋生物膜生物量。

2.2 菌落形成单位测定

通过 CFU 计数法测定生物膜的活细菌数。由图 2A 可见, 与 CTL 组相比, PT、PT+SLS 和 SLS 干预均可以显著降低生物膜活菌数 ($P < 0.05$), 而且 PT 组最低; 经致龋挑战后, PT 组和 PT+SLS 组依然保持了较低的 CFU 计数, 而且显著低于 SLS 组 ($P < 0.05$) (图 2B)。上述结果说明, 后生元牙膏能够降低生物膜活菌数, 而且在致龋环境中的活细菌量依然保持较低, 即后生元牙膏干预的生物膜具有较好的抗龋性。然而, SLS 干预后的生物膜在致龋环境中活菌数上升, 可能是 SLS 导致嗜糖细菌相对丰度上升, 致龋风险增加。但是, 致龋挑战并未显著提高 PT+SLS 组的 CFU 计数, 提示后生元对生物膜菌群的正向驱动能够抵消 SLS 的负面影响。



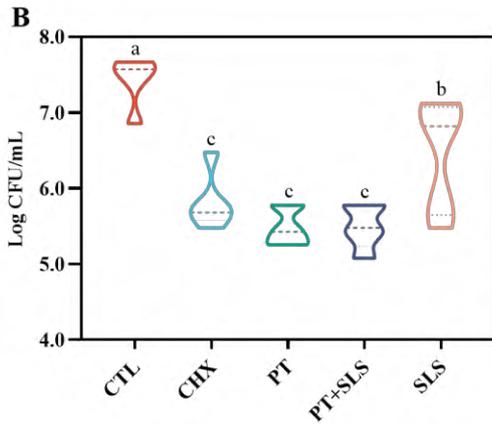


图2 后生元牙膏及SLS对生物膜活细菌数的影响

Fig. 2 Effects of postbiotic toothpaste and SLS on the viable bacterial counts in biofilms

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。
A.健康生物膜活细菌数; B.致龋生物膜活细菌数。

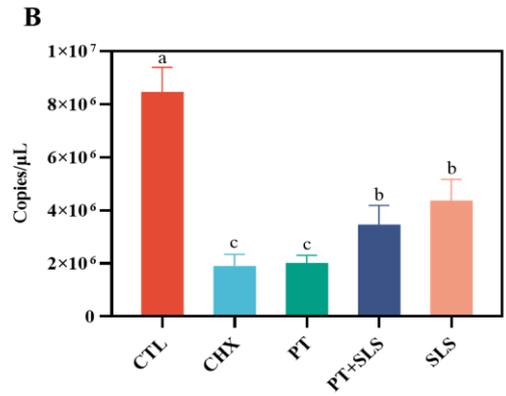


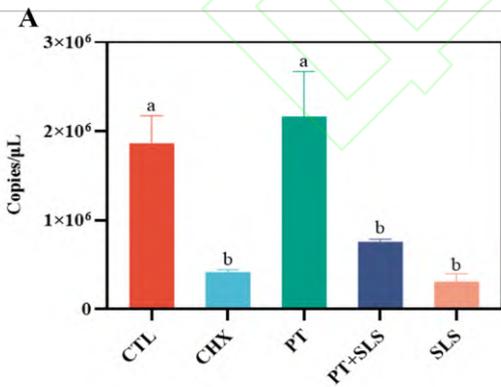
图3 后生元牙膏和SLS对生物膜细菌总量的影响

Fig. 3 Effects of postbiotic toothpaste and SLS on the total bacterial load in biofilms

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。
A.健康生物膜细菌总量; B.致龋生物膜细菌总量。

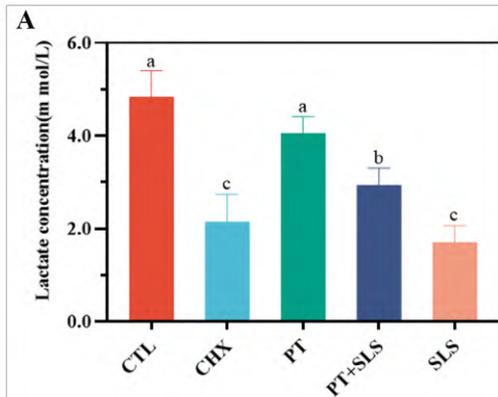
2.3 定量 PCR 分析

结合通用引物的使用, 定量 PCR 法测定生物膜细菌总量。如图 3A 所示, 在健康生物膜中, PT 组的细菌总量与 CTL 组无显著差异 ($P > 0.05$), 说明 PT 能够维持健康生物膜的正常生长状态; 经致龋挑战后 (图 3B), PT 组的生物总量显著低于 CTL 组 ($P < 0.05$), 表明其能够抑制病理性生物膜的产生, 降低嗜糖菌的丰度, 佐证了图 2 结果。SLS 处理显著降低了健康生物膜中的细菌总量, 显示出一定的抑菌能力 (图 3A); 经过致龋挑战后, SLS 处理组细菌总数显著高于 PT 组和 CHX 组, 提示 SLS 干预可能导致生物膜中嗜糖细菌相对丰度上升。



2.4 乳酸浓度测定

通过乳酸浓度测定生物膜产酸代谢能力。图 4 可见, PT 干预后的健康生物膜低于 CTL 组但无显著差异 ($P > 0.05$), 蔗糖挑战实验后产酸代谢能力最低, 且显著低于 CTL 组 ($P < 0.05$)。这一结果从乳酸代谢角度佐证了图 2 和图 3 的结果, 即后生元牙膏干预后的生物膜在健康环境下能够保持口腔菌群较好的代谢活性, 而在致龋环境中产酸较少, 抗龋齿能力较强。SLS 组在健康和致龋模型中的乳酸浓度均显著低于 CTL 组 ($P < 0.05$), 与 CHX 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示 SLS 具有一定抑菌性, 也能够抑制生物膜的有机酸代谢。



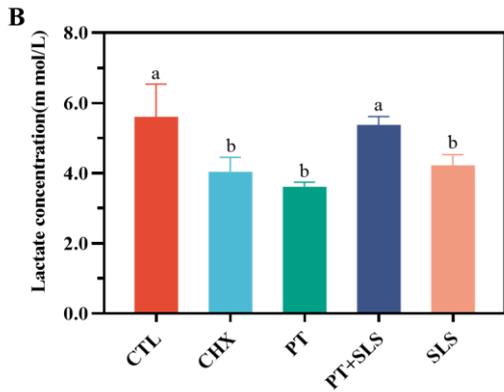


图4 后生元牙膏和SLS对生物膜乳酸浓度的影响

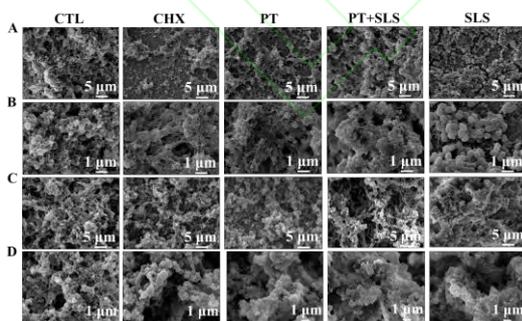
Fig. 4 Effects of postbiotic toothpaste and SLS on the concentration of lactate in biofilms

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。

A.健康生物膜乳酸浓度; B.致龋生物膜乳酸浓度。

2.5 生物膜形态结构电镜分析

SEM 结果显示, 在健康生物膜模型中, CTL、PT 和 PT+SLS 组的生物膜结构紧密, 不同菌团之间的孔隙较小, 细菌在胞外基质内紧密排列, 形成三维网络结构。然而, SLS 组的生物膜结构与 CHX 组相似, 稀疏松散, 沟壑较大, 生物膜的紧密度和厚度比 CTL 组低, 生物膜中的细菌数量也显著减少 (图 5A 和 B)。在致龋生物膜模型中, 除了 CHX 组, 其他处理组生物膜的致密性均较强, 细菌外包裹的胞外基质较多 (图 5C 和 D)。该结果与结晶紫染色和 CFU 计数结果一致。综上所述, 后生元牙膏有利于维持健康生物膜的结构和形态, SLS 具有杀灭细菌和降低胞外聚合物含量的作用。



A、B.健康生物膜 SEM 图; C、D.致龋生物膜 SEM 图。

图5 后生元牙膏和表面活性剂对生物膜形态结构的影响

Fig. 5 Effects of postbiotic toothpaste and SLS on the morphology and structure of biofilms

2.6 16S rDNA 测序分析

2.6.1 α 多样性分析

通过 Shannon 指数、Simpson 指数、Ace 指数和

Chao 指数分析了各处理组的 α 多样性。其中, Shannon 指数和 Simpson 指数既能够反映群落的多样性, 也能够反映群落的均匀度; Ace 指数和 Chao 指数则能够反映群落的丰富度^[19]。由图 6 可见, 在健康生物膜模型中 SLS 组 Shannon 指数显著高于 CHX 和 PT+SLS 组 ($P < 0.05$)、Ace 指数和 Chao 指数也明显高于其余处理组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明 SLS 干预提高了健康生物膜的 α 多样性。在致龋生物膜模型中, 各处理组 Shannon 指数和 Simpson 指数未出现显著性差异 ($P > 0.05$); SLS 组 Shannon 指数、Ace 指数和 Chao 指数相较于健康生物膜大幅度下降, 且 Ace 指数显著低于 PT 组 (图 7)。上述结果提示我们 SLS 干预提高了健康环境中生物膜的物种多样性和丰富度, 但降低了致龋环境中生物膜的物种多样性和丰富度; 后生元牙膏干预后的生物膜在致龋环境中物种多样性与健康环境基本一致, 但增加了物种丰富度, 表明其可使菌群结构保持相对稳定。

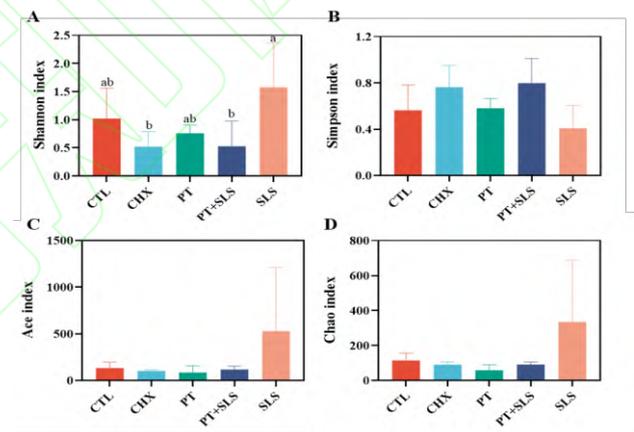


图6 不同处理组健康生物膜的 α 多样性

Fig. 6 Alpha diversity of healthy biofilms in different treatment groups

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。

A.Shannon 指数图; B.Simpson 指数图; C.Ace 指数图; D.Chao 指数图。

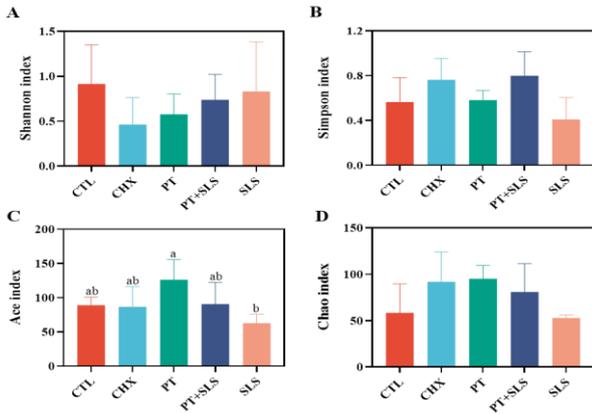


图7 不同处理组致龋生物膜的α多样性

Fig. 7 Alpha diversity of cariogenic biofilms in different treatment groups

注: abc 不同字符代表有统计学差异, ($P < 0.05$)。

A.Shannon 指数图; B.Simpson 指数图; C.Ace 指数图; D.Chao 指数图。

2.6.2 β多样性分析

采用主成分分析 (Principal components analysis, PCA) 讨论了不同处理组之间 β 多样性差异。PCA 分析显示, 健康生物膜和致龋生物膜中 PT 组均表现出较高的样本聚集度, 且与 CTL 组微生物物种组成最为相似; SLS 与 CHX 组样本分散度高, 组间差异较大 (图 8A 和图 9A)。PT 组组间距离与 CTL 组接近, 样本差异小; SLS 组组间距离与 CHX 组接近, 样本差异大 (图 8B 和图 9B)。这表明后生元牙膏干预后的生物膜与阴性对照组的生物膜结构相近, 致龋环境对其组成扰动较小。

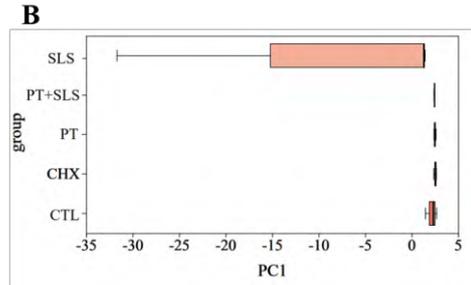
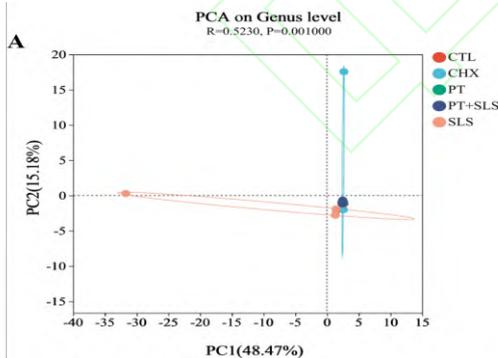


图8 不同处理组健康生物膜的组间差异

Fig. 8 Between-group differences in healthy biofilms of different treatment groups

A.主成分分析图(PCA); B.组间距离盒状图。

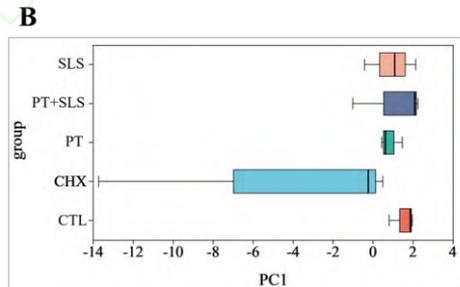
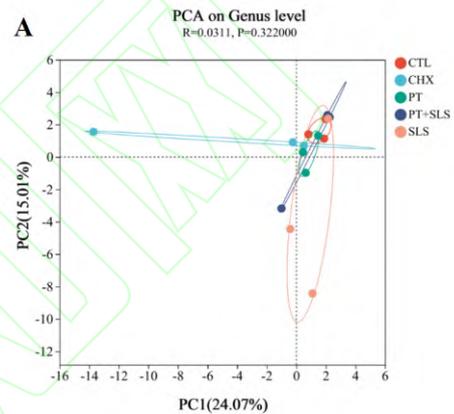


图9 不同处理组致龋生物膜的组间差异

Fig. 9 Between-group differences in cariogenic biofilms of different treatment groups

A.主成分分析图(PCA); B.组间距离盒状图。

2.6.3 物种组成分析

由各组生物膜微生物的 OTU (操作分类单元, operational taxonomic units) 所构建的 Venn 图可知, 健康生物膜的各处理组共有 614 个 OTU。所有处理组共有的 OTU 数目为 33 个, 这可能代表了口腔中稳定存在的菌种。CTL、CHX、PT、PT+SLS 和 SLS 5 种干预方式特有的 OTU 个数依次为 14、45、3、7、372 (图 10A)。致龋生物膜中, 各处理组共有 192 个 OTU。所有处理组共有的 OTU 数

目为 34 个。CTL、CHX、PT、PT+SLS、SLS 5 种干预方式特有的 OTU 个数依次为 8、17、9、56、10 (图 11A)。CHX、PT+SLS 和 SLS 组群落结构发生较大变化, 菌群结构不稳定。

图 10B 和图 11B 显示了各处理组的生物膜微生物组成在属水平上的差异。在健康生物膜中, 属水平的群落丰度百分比进一步揭示了 SLS 组生物膜的类群具有较高的多样性, 其主要由链球菌属 (*Streptococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和栖热菌属 (*Thermus*) 组成 (图 10B)。致龋生物膜模型中, SLS 组生物膜物种多样性锐减, 主要物种包括链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属和韦荣氏球菌属 (图 11B)。

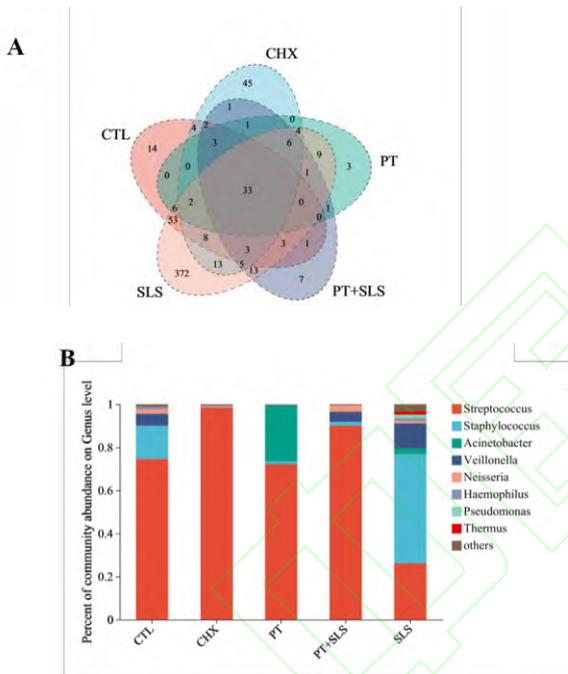


图 10 不同处理组健康生物膜的物种组成结构

Fig. 10 Community composition of healthy biofilms in different treatment groups

A. 各组生物膜 OTU 样本分布韦恩图; B. 基于属水平上的微生物群落结构分析。

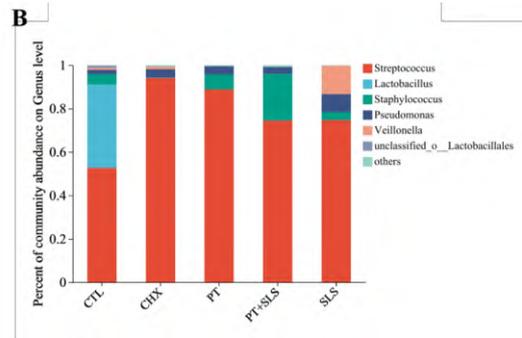
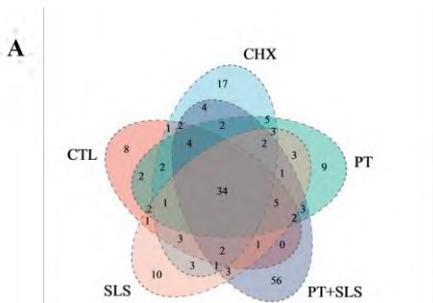


图 11 不同处理组致龋生物膜的物种组成结构

Fig. 11 Community composition of cariogenic biofilms in different treatment groups

A. 各组生物膜 OTU 样本分布韦恩图; B. 基于属水平上的微生物群落结构分析。

2.6.4 优势物种分析

通过分析属水平上特征菌的丰度可知, 健康生物膜模型中, PT 组链球菌属、韦荣氏球菌属和嗜血杆菌属 (*Haemophilus*) 的丰度与 CTL 组相当; SLS 降低了链球菌属和奈瑟氏菌属的相对丰度, 增加了葡萄球菌属、韦荣球菌属和嗜血杆菌属的相对丰度, 其中葡萄球菌属的升高尤为显著, 占比 50.83% (图 12)。致龋生物膜模型中, SLS 干预提高了链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属和韦荣球菌属的相对丰度, 其中以假单胞菌属和韦荣球菌属变化最为显著, 其占比分别达到 8.29% 和 13.08% (图 13)。以上结果表明, 在健康生物膜和致龋生物膜模型中, SLS 干预可能会导致某些潜在致病菌的丰度增加, 破坏菌群结构与稳态。

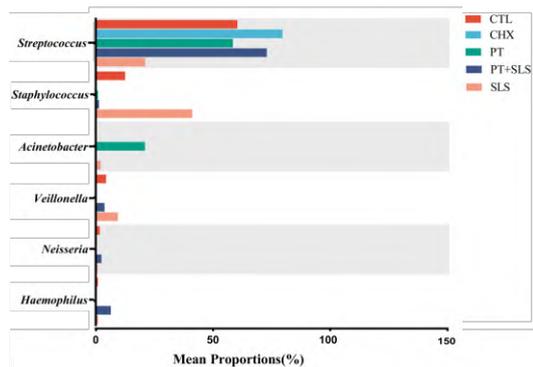


图 12 不同处理组健康生物膜的优势物种

Fig. 12 Dominant species of healthy biofilms in different treatment groups

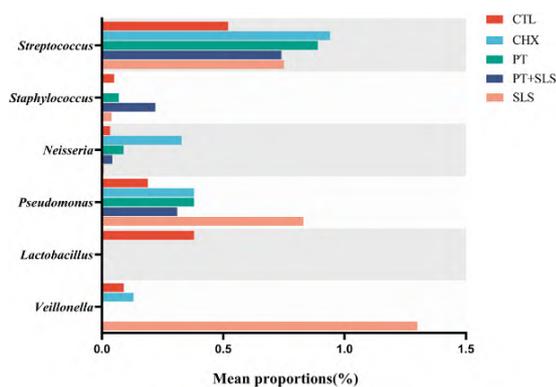


图 13 不同处理组致龋生物膜的优势物种

Fig. 13 Dominant species of cariogenic biofilms in different treatment groups

3 讨论与结论

龋齿是普遍存在于人体的一种慢性疾病，是由致龋细菌介导、可发酵的碳水化合物驱动的动态疾病^[20]。研究发现，龋病人群微生物群落结构、组成及代谢较健康人群更为复杂，且大多以生物膜的形式存在，生物膜是维持口腔微生态平衡的重要屏障之一^[21]。新兴的“生态菌斑学说”认为牙菌斑生物膜内微生物之间、微生物与宿主之间处于动态的生态平衡，不易发生疾病。一旦条件改变，如摄入大量的糖类食物、口腔内局部条件的改变、机体的抵抗力下降等，正常口腔生物膜细菌的生理性组合会变为病理性组合，发生龋病。因此，龋病有效防治的重点应该是设法将口腔细菌的病理性组合恢复为生理性的生态平衡^[22]。通过生物膜来调节口腔微生态是预防和治疗龋齿等口腔慢性感染性疾病的新方法^[23]。考虑到后生元能够调整口腔微生态，SLS作为牙膏起泡剂对口腔微生态的影响仍存在争议。本研究探讨了牙膏成分中的后生元和SLS对口腔微生态和抗龋性的影响。

本研究采用可实现主动附着的AAA装置建立了体外口腔微观世界模型，包括健康生物膜和致龋生物膜，并进一步采用结晶紫染色、CFU测定、qPCR分析、乳酸测定、SEM观察和16S rDNA测序等多种方法对生物膜的生长和菌群结构进行了系统评价。其中，结晶紫染色是一种非特异性染色方法，可以定量所有类型的生物量，包括胞外多糖、死细菌和活细菌^[24]。CFU计数是测定活菌数量的有效方法。在通用引物的帮助下，qPCR可以分析包括死亡细菌和活细菌在内的细菌总量^[25]。此外，由于乳酸的产生是口腔生物膜转化为病理表型（如龋齿）的关键因素，同时乳酸含量能够表示生物膜的代谢活性^[26]，因此本研究中检测了乳酸浓度。通过

扫描电镜观察，能够分析生物膜中的细菌形态与细胞外基质的网状结构。16S rDNA测序可以进一步揭示口腔生物膜中的微生物多样性和物种组成。因此，本研究通过将以上多种方法相结合，从不同角度对口腔生物膜进行了全面系统研究。

本研究发现后生元牙膏干预后的健康生物膜模型中的生物量、细菌总量、代谢活性菌及生物膜形貌均与阴性对照组相似，表明其能够有效维持健康生物膜的正常生长和结构稳态。在致龋环境中，后生元牙膏干预组的细菌活性、细菌总量和代谢活性均较低，说明后生元牙膏干预后的生物膜抗龋性较强。Schwendicke等^[27]研究也表明热灭活动物双歧杆菌BB12在体外可以降低生物膜的致龋性。我们的研究结果还显示，SLS能够显著降低健康生物膜的生物量、活菌数和细菌总数，破坏生物膜的三维支架结构，表明SLS具有一定的杀菌作用，并能够减少胞外多糖含量。这一结果与前人研究结果一致，即SLS作为一种表面活性剂，可以抑制细菌并发挥抗菌活性^[28,29]。然而在致龋环境中，SLS干预后的生物膜生物量、活菌数、细菌总数和代谢活性上均有所上升，这表明SLS干预导致生物膜在致龋环境中的生长和代谢旺盛，提高了龋病发生的风险。

为了进一步探究相关机制，我们进行了16S rDNA测序。结果显示后生元牙膏干预组的 α 多样性在健康和致龋生物膜模型中与阴性对照组均无显著差异。后生元牙膏干预组的 β 多样性结构也与阴性对照组最为接近。上述结果说明，后生元能够维持健康口腔生物膜的微生态结构，并调节致龋生物膜的菌群结构，具有较好的抗龋潜力。这可能是后生元通过抑制致病菌或者与致病菌争夺黏附位点等机制来调节微生物区系的物种组成菌落结构^[30,31]。在健康生物膜模型中，SLS干预组表现出较高的 α 多样性，特有的OUT数目高达372个，葡萄球菌属为优势物种。经过致龋挑战后，SLS组特有的OTU数锐减为10个， α 多样性（Ace指数）也显著降低，韦荣球菌属、假单胞菌属成为优势物种。假单胞菌属是一种广泛分布于自然环境和人体的革兰氏阴性菌，是最常见的条件致病菌^[32]。韦荣氏球菌属能够与链球菌属共聚集和黏附、促进生物膜形成，并在代谢方面具有协同生长作用^[33]。可见，SLS干预的生物膜虽然具有较高的 α 多样性，但是其菌群结构趋向于病理性生物膜，且鲁棒性差，是一种不稳定的结构。SLS的广谱抑菌性虽然在控制口腔致病菌，清洁口腔方面具有一定的积极意义，但是对

于通过接种健康受试者唾液建立的健康口腔生物膜模型,其无差别的抑菌性破坏了口腔微生态平衡,导致菌群失调^[34-36]。

虽然 SLS 干预组的结果提示了 SLS 可能是口腔微生物潜在的风险物质,但是在实际应用中并不存在 SLS 单独使用的可能性。而且,我们发现在后生元牙膏中添加 SLS (PT+SLS 组),其各种指标的监测结果趋向于 PT 组,表明后生元对于口腔微生态的正向作用能够极大降低 SLS 对口腔微生态的扰动。

综上所述,后生元牙膏能够维持健康生物膜的生长和代谢,通过维持生物膜的生理性平衡,使其在 2%蔗糖刺激下表现出较好的抗龋能力。SLS 有一定抑菌和抑制产酸的能力,但其能够破坏健康生物膜结构,并造成生物膜的病理性结构,是一种致龋风险因素。但是,牙膏中后生元的添加能够极大降低 SLS 单独使用表现的对口腔生物膜的破坏作用,因此后生元牙膏中的 SLS 并不足以引起口腔微生态失调。本研究从多角度分析了后生元牙膏和牙膏中的 SLS 对健康口腔生物膜和抗龋性的影响,希望能够为未来牙膏护理成分的开发和应用提供参考。

参考文献:

- [1] BAKER J L, WELCH J L M, KAUFFMAN K M, et al. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2024, 22(2): 89-104.
- [2] GAO L, XU T S, HUANG G, et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body[J]. *Protein & cell*, 2018, 9(5): 488-500.
- [3] MAIER T. Oral microbiome in health and disease: maintaining a healthy, balanced ecosystem and reversing dysbiosis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1453.
- [4] WILLIS J R, ABALDÓN T. The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 308-308.
- [5] 贾凝. 口腔综合保健对儿童龋齿的预防效果研究[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2018, 5(19): 111-115.
- [6] 王兴, 冯希平, 李志新. 第四次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 1-34.
- [7] 乌日汉, 郭小娟, 王怡, 等. 牙菌斑生物膜的形成与控制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(11): 1950-1960.
- [8] 刘筱娣, 郭丽宏. 变形链球菌生物膜形成相关基因的研究进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2006, 35(9): 532-535.
- [9] AGUILAR-TOALA J E, ARIOLI S, BEHARE P, et al. Postbiotics-when simplification fails to clarify[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(11): 825-826.
- [10] BASIR L, MOGHIMIPOUR E, SAADATZADEH A, et al. Effect of postbiotic-toothpaste on salivary levels of IgA in 6-to 12-year-old children: Study protocol for a randomized triple-blind placebo-controlled trial[J]. *Frontiers in pediatrics*, 2022, 10: 1042973.
- [11] 刘清. 基于 16S rRNA 全长测序的后生元含片辅助龋病充填治疗人群的口腔菌群分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [12] DI PIERRO F, ZANVIT A, NOBILI P, et al. Cariogram outcome after 90 days of oral treatment with *Streptococcus salivarius* M18 in children at high risk for dental caries: results of a randomized, controlled study[J]. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 2015, 7: 107-113.
- [13] HOMAYOUNI RAD A, POURJAFAR H, MIRZAKHANI E. A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1120995.
- [14] PETERSEN F C, ASSEV S, SCHEIE A A. Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells[J]. *Archives of Oral Biology*, 2006, 51(8): 665-671.
- [15] NORDSTROM A, MYSTIKOS C, RAMBERG P, et al. Effect on de novo plaque formation of rinsing with toothpaste slurries and water solutions with a high fluoride concentration (5,000 ppm)[J]. *European Journal of Oral Sciences*, 2009, 117(5): 563-567.
- [16] SALTON M R. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability [J]. *The Journal of general physiology*, 1968, 52(1): 227-252.
- [17] EXTERKATE R A M, CRIELAARD W, TEN CATE J M. Different response to amine fluoride by streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model[J]. *Caries research*, 2010, 44(4): 372-379.
- [18] TIAN Y, HE X, TORRALBA M, et al. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2010, 25(5): 357-367.
- [19] FAN X, ZHANG Y, SONG Y, et al. Compound Danshen Dripping Pills moderate intestinal flora and the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in alleviating

- cognitive dysfunction in type 2 diabetic KK-Ay mice[J]. *Phytomedicine*, 2023, 111: 154656.
- [20] LIU G, WU C, ABRAMS W R, et al. Structural and functional characteristics of the microbiome in deep-dentin caries[J]. *Journal of dental research*, 2020, 99(6): 713-720.
- [21] 史彦, 李成杰, 张明正, 等. 龋齿及牙周病患者与健康人群口腔微生态的比较研究[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(12): 1265-1268.
- [22] ROSIER B T, JAGER M E, EZAURA E, et al. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 92.
- [23] 蒋倩. 老年人群根龋和冠部龋口腔微生物群落结构分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [24] LI X G, YAN Z, XU J P. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*[J]. *Microbiology-Sgm*, 2003, 149: 353-362.
- [25] 赵智颖, 李良秋, 马连营, 等. 生物膜定量分析方法研究进展[J]. *生物技术进展*, 2016, 6(5): 319-327.
- [26] 邹政. MB-PDT 与 HMME-PDT 对变形链球菌菌斑生物膜作用的对比研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [27] SCHWENDICKE F, HORB K, KNEIST S, et al. Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro[J]. *Archives of Oral Biology*, 2014, 59(12): 1384-1390.
- [28] WAALER S M, ROLLA G, SKJORLAND K K, et al. Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: a pilot study[J]. *Scandinavian journal of dental research*, 1993, 101(4): 192-195.
- [29] JENKINS S, ADDY M, NEWCOME R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses.(II). Effects of 4-day plaque regrowth[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 1991, 18(2): 145-148.
- [30] BACIC M. Clinical evaluation of periodontal diseases[J]. *Acta stomatologica Croatica*, 1982, 16(4): 295-305.
- [31] ZHANG Y, DING Y, GUO Q. Probiotic species in the management of periodontal diseases: An overview[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 806463.
- [32] SZYMANSKA J, SITKOWSKA J, DUTKIEWICZ J. Microbial contamination of dental unit waterlines[J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2008, 15(2): 173-179.
- [33] 罗瑜雪, 孙蔓琳, 施培磊, 等. 韦荣球菌与口腔疾病的研究进展[J]. *华西口腔医学杂志*, 2020, 38(5): 576-582.
- [34] LEE J H, JUNG J Y, JEONG Y J, et al. Involvement of both mitochondrial and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts[J]. *Toxicology*, 2008, 243(3): 340-347.
- [35] SHAHEEN S S, RRDDY P, HEMALATHA, et al. Antimicrobial efficacy of ten commercially available herbal dentifrices against specific oral microflora - *in vitro* study[J]. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 2015, 9(4): ZC42-46.
- [36] MARTIN R, LANGELLA P. Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions[J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 1047.