

[文章编号] 1000-1182(2010)02-0115-04

· 专家论坛 ·

人体口腔微生物组群与牙菌斑生物膜

周学东¹ 施文元²

(1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;
2. 美国加州大学洛杉矶分校牙学院, 美国 洛杉矶 CA 90045)

[摘要] 牙菌斑是由多种微生物组成的生物膜结构, 口腔微生物之间的相互作用可以影响牙菌斑生物膜的性质、形成、毒力, 以及微生物在生物膜结构中的定位和定植。生物膜内细菌之间存在的信号传导对生物膜的形成及其毒力具有影响。本文重点介绍人体口腔微生物组群与牙菌斑生物膜关系的最新研究进展。

[关键词] 口腔微生物组群; 牙菌斑生物膜; 信号传导

[中图分类号] R 781 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.02.001

Human oral microbial community and dental plaque biofilm ZHOU Xue-dong¹, SHI Wen-yuan². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. School of Dentistry, University of California, Los Angeles, CA 90045, USA)

[Abstract] Dental plaque is structurally a kind of biofilm which contains a variety of micro-organisms. The inter-reaction of oral micro-organisms may affect the nature, forms, and toxicity of the dental plaque biofilm, as well as the localization and field planting of bacteria inside the biofilm. The signal transduction existed between the bacterium has an important effect on the formation and virulence of bacterial biofilm. This reviewing paper focuses on the latest research progress of human oral microbial community and dental plaque biofilm.

[Key words] oral microbial community; dental plaque biofilm; signal transduction

按照微生物生理学的理论, 口腔微生物群落是典型的生物膜。生物膜中的细菌具有一些特殊的性质。当细菌处于生物膜状态时, 对抗生素具有更大的抗药性^[1-2]。由于牙菌斑生物膜的多种群特性, 口腔微生物群落是研究种群间相互作用的最理想的生物膜模型之一, 口腔微生物之间的相互作用会对人体群落整体带来影响。牙菌斑生物膜并非细菌结构上简单叠加, 而是构建起复杂的微生物群落, 具有生物膜结构和微生物生理学的功能^[3]。将牙菌斑生物膜的整体行为与参与菌斑形成的个别细菌种群行为联系起来, 牙菌斑生物膜具有高度的结构性。在菌斑生物膜形成过程中, 一些细菌是早期定植者, 能有效黏附于牙齿或牙周组织上, 稍晚定植细菌则具有黏附早期定植者的结构成分, 这些成分常常具有代谢或其他竞争性优势^[4]。在成熟菌斑中, 特定种属的细菌往往彼此相邻, 或混合在一起形成特殊的结构, 并具有黏附或生长优势。

1 微生物相互作用对牙菌斑生物膜性质的影响

生物膜细菌的相互作用可以影响细菌对抗生素的相对敏感性。研究发现, 含有变异链球菌和小韦荣菌的体外生物膜比只含有单种细菌的生物膜对氯己定有更强的抵抗力^[5]。虽然这种变化的分子学基础尚不清楚, 但这2种细菌的共同作用应该是导致这种变化的原因。

变异链球菌与戈登链球菌这2种菌斑中共生的口腔链球菌常常具有相反的性质。戈登链球菌可以通过失活感受态刺激肽(competence stimulating peptide, CSP)来拮抗一些变异链球菌的群体感应依赖机制。CSP失活后, 变异链球菌对一系列抗生素的抵抗作用也减弱了。因此, 戈登链球菌可以通过增加变异链球菌对内源性抗生素如富组蛋白的敏感性拮抗变异链球菌在生物膜中的定植^[6]。

动物实验发现2种或2种以上口腔细菌的协同作用可增强毒力^[7]。在鼠脓肿模型中, 牙龈卟啉单胞菌和福塞斯坦纳菌的多重感染可导致比单菌种感染更大的病损以及更高的死亡率。牙龈卟啉单胞菌与具核梭杆菌, 牙龈卟啉单胞菌与齿垢密螺旋体,

[收稿日期] 2010-02-10; [修回日期] 2010-03-11

[作者简介] 周学东(1957—), 女, 四川人, 教授, 博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501481

牙龈卟啉单胞菌与伴放线放线杆菌的协同作用也由小鼠脓肿模型证实。虽然合作代谢相互作用可能不能完全解释多重感染的毒力增强,但其会促进病原菌生长,导致或加速感染过程。

2 微生物相互作用对牙菌斑生物膜组成菌定位的影响

生物膜成员间的相互作用提示,这些作用的网状效应可能影响特定生物在生物膜结构中的定位与定植。通过荧光染色细胞,可观察到体外生物膜中牙龈卟啉单胞菌往往定植于戈登链球菌聚集的区域^[8]。一些生物在生物膜中的分布并非是随机的。这可能是一些生物膜中的“先锋菌”通过一些之前描述过的积极相互作用定植的结果。一种生物对另一种生物的消极作用也可能导致2种细菌的彼此分离。因此,在牙菌斑生物膜中变异链球菌与血链球菌应处于不同的区域。

生物膜中细菌通过聚集可以使居住地合理化。Gibbons等^[9]研究证实,一些特定的口腔细菌可以彼此聚集。牙龈卟啉单胞菌可以与一些口腔链球菌聚集,在这些口腔链球菌组成的生物膜上定植。提示这可能是牙龈卟啉单胞菌进入早期主要由链球菌构成的菌斑的重要机制。牙龈卟啉单胞菌与口腔链球菌的聚集提高了二者在生物膜中定植的能力^[10]。最近研究表明,一些不参与生物膜形成的细菌,在有某些潜在协同菌的情况下亦可形成生物膜。齿垢密螺旋体在大多数内表面并不能形成生物膜,牙龈卟啉单胞菌则可稳定形成生物膜。密螺旋体亦可进入生物膜中,位于牙龈卟啉单胞菌的周围^[11]。内表面定植能力很弱的福塞斯坦纳菌在具核梭杆菌存在的情况下也可进入生物膜。这种协同作用在体内生物膜形成中具有重要意义,这2对微生物都常常在同一菌斑中被观察到相互关联。

3 信号传导对牙菌斑生物膜形成的影响

信号传导在单种属生物膜形成中发挥作用^[12]。在受到其他可代谢或运输信号分子的前驱生物膜成员的干扰时,产生此分子的生物可能会被拮抗。群体感应调节分子AI-2被认为是一种生物膜异种细菌间的潜在信号分子,AI-2合酶基因luxS无处不在,许多微生物都具有,包括口腔细菌^[13]。口腔中一种微生物可以弥补另一种属微生物的luxS介导缺陷,提示AI-2分子具有跨种属属性。AI-2信号分子是体外混合生物膜形成所必需的。在这一模型系统中,AI-2的存在被证明是牙龈卟啉单胞菌-戈登链球菌形成生物膜所需的成分。

当2个菌株均为luxS突变时,无法形成混合生物膜,如果只有一方为突变株,则可形成生物膜^[14]。正如之前提到的,这种相互作用对牙龈卟啉单胞菌进入革兰阳性微生物占优势的早期生物膜非常重要。另外,还有研究证实AI-2也介导了口腔链球菌和内氏放线菌共生生物膜的形成。该研究还发现,AI-2具有一个最佳浓度,高于或低于此浓度都将抑制生物膜的形成。因此,可以认为AI-2介导了口腔生物膜中的相互作用。

Merritt等^[15]发现,敲除变异链球菌的luxS将破坏高细胞密度时变链素 的产生。通过基因芯片分析,一个被Los Alamos国家实验室口腔病原序列数据库注为Smu1274的推定转录抑制剂被识别,在luxS突变时其会被明显诱发。Smu1274被命名为独立诱导因子irvA,可以发挥可诱导抑制剂的作用抑制变链素 基因表达。luxS及irvA双突变株则可重获产生变链素 的能力。这些发现提示了群体感应在变链素产生中的作用,显露了变异链球菌在口腔微生物群落生态平衡活动中的一条新的调控途径。

大多数口腔链球菌,包括变异链球菌、戈登链球菌和血链球菌,均表达CSP介导的信号转导系统^[4]。这些分子显示出高度种属特异性,一种微生物的CSP不会干扰另一种CSP的活动。一些戈登链球菌菌株可以抑制变异链球菌的CSP依赖性。这是由戈登链球菌产生的一种叫challisin的蛋白酶所介导的,challisin可抑制变异链球菌产生CSP。这便增加了其他具有高度蛋白水解能力的牙菌斑干扰致龋链球菌和其他使用多肽信号分子的细菌信号转导机制的可能性。牙龈卟啉单胞菌可以干扰变异链球菌的活性依赖转化。

最近通过体外生物膜系统对戈登链球菌和非典型韦荣菌之间的信号传导进行了研究,结果证明定植和局部信号分子浓度在信号传导中具有重要作用^[16]。

生物膜成员间的基因互换对生物膜的生理和进化具有重要作用。通过多种细菌基因组测序发现,菌斑生物膜中的组成菌紧密接触是由于其具有基因交换的传导性。

对一些口腔细菌的基因组测序证实了一些微生物如牙龈卟啉单胞菌染色体上“致病岛”的存在,该区域的G+C比与染色体其余部分有差异,提示这些特殊的基因序列可能是从其他微生物转移至牙龈卟啉单胞菌。Tribble等^[17]研究证实,一些牙龈卟啉单胞菌菌株间的染色体DNA可进行转移。虽然这种交换没有直接在菌斑生物膜中观察到,但生物膜细菌相互间的紧密邻接使得这种相互作用具有高度可

行性。口腔细菌与非口腔定植的过路菌之间抗药性标志物的交换也具有显著的药理意义。

介导基因交换的潜在机制可能包括结合、转化和转导。涉及口腔链球菌的结合早在30年前已被证实——虽然不是直接在生物膜中。浮游状态下口腔链球菌间的质粒转化也已被证实。最近一项体外生物膜研究显示,存在于齿垢密螺旋体中的梭状质粒可转化到戈登链球菌中。生物膜中具有自然转化性的口腔链球菌间可进行染色体片断交换。体外生物膜中,变异链球菌溶解释放出的DNA片断可转化邻近接触的细胞,这一事实进一步证实了上述论点。虽然转导已在个别口腔细菌中证实,但尚未观察到由噬菌体介导的不同种属间的基因交换。从生物膜单个细菌的实验结果看,菌斑生物膜中的基因交换是有可能发生的^[18]。

Kreth等^[19]研究了口腔细菌群落的基因交换,发现变异链球菌具有CSP诱导活性和产变链素基因的协调表达功能。在变异链球菌和获得了梭状质粒的戈登链球菌混合培养中,质粒DNA通过CSP和变链素依赖方式从戈登链球菌传递到了变异链球菌。进一步分析证实,纯化变链素提取物可增加戈登链球菌释放DNA。在这些发现的基础上推测,口腔生物膜中的变异链球菌可以利用活性诱导变链素的产生获得相同微环境中不同种属细菌的转化DNA。这一假说与已被证实的不同变异链球菌菌株间广泛存在的基因多态性是一致的。这种多态性可能是大量水平基因传递的结果。

4 菌群相互作用对牙菌斑生物膜毒力的影响

细菌间相互作用可以影响一种细菌或一组相关细菌的生长。这种相互作用也可对生物膜成员的毒力特性产生特殊影响,从而改变生物膜的总体致病性^[20]。从这一点考虑,菌斑中能够中和变异链球菌酸性代谢产物的细菌可以通过代谢乳酸或产生碱来减低生物膜的致龋性,后者包括产生氨以及一些菌斑微生物的尿素酶表达。由于唾液中存在显著比例的尿素,尿素酶可以将其转化为氨。

细菌毒力因子的表达受到严格调控。在一些情况下这种调控依赖于群体感应机制^[21]。这种机制可能依赖特定的调节剂如链球菌和铜绿假单胞菌群体感应中的调节剂,也可能依赖AI-2这样的表达于许多微生物中的调节剂。只要生物膜中的微生物能降低这种调节分子的相对浓度,就可以对生物膜的致病性产生影响。变异链球菌产生变链素依赖于其群体感应调控剂CSP的相对浓度。变链素被认为是一种毒力因子,可以抑制相对非致龋菌的生长,降低

变异链球菌CSP水平可以减低生物膜的致龋性^[22]。由于非致龋菌戈登链球菌的存在可以失活变异链球菌CSP,所以生物膜中的戈登链球菌能降低其毒力。CSP也可能调节变异链球菌的其他毒力特性。

牙周致病菌伴放线放线杆菌的毒力特性之一是释放白细胞毒素。这种蛋白的表达也依赖于AI-2水平。通过降低这种信号分子水平的共生菌就可以影响毒素的表达^[23]。因此,生物膜细菌对AI-2的竞争可以调节局部AI-2浓度,并影响生物膜的毒力。

5 宿主因素对牙菌斑生物膜微生物的影响

作为一个微生态系统,牙菌斑生物膜的生存能力依赖于菌斑组成菌的相互作用,也与非微生物环境的相互作用相关。宿主对菌斑生物膜最显著的影响之一便是营养物质的供给。唾液腺持续分泌唾液为一些口腔生物膜细菌提供了潜在的营养物质来源^[24]。这些口腔液体中含有蛋白质、糖蛋白、多肽,以及能刺激菌斑生物膜组成菌生长的矿物质(钙和铁)。龈沟液是另一个内源性营养来源,含有宿主蛋白,如白蛋白、糖蛋白、含血红素分子。这个营养来源对龈沟微生物定植具有重要影响。口腔液体中的一些糖蛋白可以结合到牙齿获得性膜表面,并且是形成菌斑生物膜的先锋菌的黏附素受体。因此,这些分子对决定哪些种属的细菌可以定植在口腔的哪些部位具有重要作用。

口腔卫生欠佳时,细菌在牙齿龈缘处积聚,可导致周围组织的炎症,引起血清渗入口腔中。红细胞含有的血红素是一些口腔细菌如牙龈卟啉单胞菌所需的氯高铁血红素的重要来源^[25]。这种渗出在菌斑中革兰阳性细菌占优势向革兰阴性厌氧菌如与牙周炎相关的牙龈卟啉单胞菌含量大量增加的转化中有重要作用。

口腔周围的宿主组织也可分泌抗菌物质如富组蛋白和防御素^[26-27]。一系列口腔细菌,包括变异链球菌,都对唾液腺分泌的防御素敏感。然而一些细菌,如齿垢密螺旋体,则对特定的防御素具有抵抗作用。由于生物膜中的细菌相对于浮游状态的细菌,对抗菌物质普遍有较强的抵抗力,因此内源性抗生素在调节生物膜性质方面是否具有显著作用尚不清楚。

口腔中的宿主细胞也可分泌免疫调节因子影响菌斑的性质^[28]。唾液分泌物含有免疫球蛋白A抗体,由口腔中分泌腺产生。其中一些可以直接对抗生物膜微生物表达的抗原。这些抗体能否穿透菌斑基质干扰细菌性质目前尚不清楚。主动或被动免疫诱导产生的抗体可以干扰唾液中潜在口腔致病菌的定

植, 可以作为研究抗龋及抗牙周炎疫苗的基础^[29]。

【参考文献】

- [1] Kara D, Luppens SB, van Marle J, et al. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271(1): 90-97.
- [2] Kara D, Luppens SB, Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine[J]. Eur J Oral Sci, 2006, 114(1) 58-63.
- [3] Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, et al. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay[J]. Infect Immun, 1975, 11(6) :1252-1260.
- [4] Wang BY, Kuramitsu HK. Interactions between oral bacteria : Inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1) : 354-362.
- [5] Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE. Rapid succession with in the *Veillonella* population of a developing human oral biofilm *in situ*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(11) :4117-4124.
- [6] Matsumoto-Nakano M, Kuramitsu HK. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(23) :8095-8102.
- [7] Yoneda M, Hirofuji T, Anan H, et al. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model : Involvement of gingipains in a synergistic effect [J]. J Periodontal Res, 2001, 36(4) 237-243.
- [8] Slots J, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. asaccharolyticus to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets[J]. Infect Immun, 1978, 19(1) 254-264.
- [9] Gibbons RJ, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria[J]. Arch Oral Biol, 1970, 15(12) :1397-1400.
- [10] Vesey PM, Kuramitsu HK. Genetic analysis of *Treponema denticola* ATCC 35405 biofilm formation[J]. Microbiology, 2004, 150 (Pt 7) 2401-2407.
- [11] Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, et al. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation[J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(1) 39-42.
- [12] Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. J Bacteriol, 2003, 185(3) :1027-1036.
- [13] Bassler BL. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria [J]. Cell, 2002, 109(4) :421-424.
- [14] Rickard AH, Palmer RJ Jr, Blehert DS, et al. Autoinducer 2 : A concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth[J]. Mol Microbiol, 2006, 60(6) :1446-1456.
- [15] Merritt J, Kreth J, Shi W, et al. LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(4) :960-969.
- [16] Eglund PG, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*-*Veillonella atypica* biofilms : Signaling in flow conditions requires juxtaposition[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(48) :16917-16922.
- [17] Tribble GD, Lamont GJ, Progulske-Fox A, et al. Conjugal transfer of chromosomal DNA contributes to genetic variation in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Bacteriol, 2007, 189 (17) :6382-6388.
- [18] Li YH, Lau PC, Lee JH, et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms[J]. J Bacteriol, 2001, 183(3) :897-908.
- [19] Kreth J, Merritt J, Shi W, et al. Co-ordinated bacteriocin production and competence development : A possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(2) :392-404.
- [20] Morou-Bermudez E, Burne RA. Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*[J]. Infect Immun, 1999, 67(2) :504-512.
- [21] van der Ploeg JR. Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence[J]. J Bacteriol, 2005, 187(12) : 3980-3989.
- [22] Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections[J]. J Clin Invest, 2003, 112 (11) :1626-1632.
- [23] Spitznagel J Jr, Kraig E, Kolodrubetz D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*[J]. Infect Immun, 1991, 59(4) :1394-1401.
- [24] Bowden GH, Li YH. Nutritional influences on biofilm development[J]. Adv Dent Res, 1997, 11(1) :81-99.
- [25] Bramanti TE, Holt SC. Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50[J]. J Bacteriol, 1991, 173(22) :7330-7339.
- [26] Kelly CG, Younson JS, Hikmat BY, et al. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(1) :42-47.
- [27] Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity[J]. J Oral Pathol Med, 2001, 30(6) :321-327.
- [28] Darveau RP. Oral innate host defense responses : Interactions with microbial communities and their role in the development of disease [M]//Kuramitsu HK, Ellen RP. Oral bacterial ecology : The molecular basis. Wymondham, United Kingdom : Horizon Science Press, 2000 :169-218.
- [29] Koga T, Oho T, Shimazaki Y, et al. Immunization against dental caries[J]. Vaccine, 2002, 20(16) :2027-2044.

(本文编辑 李彩)