

[文章编号] 1000-1182(2007)03-0226-04

口臭研究模型的建立及其对口腔致臭菌的确定

胡 贇¹, 胡德渝², 郑雷蕾³, 林居红¹

(1.重庆医科大学附属口腔医院 预防科, 重庆 400015;

2.四川大学华西口腔医院 预防科; 3.正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 建立一个可模拟口臭代谢过程的唾液沉淀物系统,同时分析几种细菌对口臭产生的影响,为致臭菌的确定提供依据。方法 收集10名牙周健康个体的刺激性全唾液10份。调整离心全唾液的上清液和沉淀物的比例,建立口臭研究模型,在37℃兼性厌氧条件下孵育使其产生臭味,7h内每隔1h分别用鼻闻法检测气相和液相的臭味指数,用Halimeter测量挥发性硫化物(VSCs)水平,用玻璃电极测量pH值。在经过1h孵育后的口臭模型内,分别加入可疑致臭菌(牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌)菌悬液以及作为对照的非致臭菌(伴放线放线杆菌)菌悬液和蒸馏水,继续在37℃兼性厌氧条件下孵育,在余下的6h内每隔1h测量1次各组的臭味指数、VSCs水平及pH值。结果 调整离心全唾液比例后的口臭模型能模拟口臭代谢过程,产生明显的臭味。在孵育1h后的口臭模型内,加入可疑致臭菌菌悬液后,臭味产生相对于伴放线放线杆菌组和蒸馏水组高,牙龈卟啉单胞菌组相对显著。结论 孵育离心全唾液为研究口臭产生的有用模型。通过改变致臭细菌的数目来改变微生物负载,对细菌代谢的活性会产生影响,从而影响臭味的形成,可以此来确定致臭菌。

[关键词] 口臭; 挥发性硫化物; 口臭模型

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

Establishment of Malodor Model and Its Effects on Identifying the Halitosis-related Bacteria HU Yun¹, HU De-yu², ZHENG Lei-lei³, LIN Ju-hong¹. (1. Dept. of Preventive Dentistry, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400015, China; 2. Dept. of Preventive Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To establish a salivary sediment malodor system, and to evaluate the effect of several kinds of bacteria dedicated to the halitosis formation, hence to identify halitosis-correlated bacteria. Methods The proportion of the supernatant and sediment, gained from centrifugal whole saliva, was adjusted to establish a salivary sediment malodor system incubated in facultative aerobic environment under 37℃ for 7 hours. The halitosis indexes in both gaseous phase and liquid phase were checked by direct sniffing, and volatile sulphur compounds(VSCs) and pH were determined by halimeter and glass electrode respectively between hours to evaluate the malodor formation. The suspended fluid of suspicious halitosis-correlated bacteria and non-halitosis-correlated bacteria and water control were introduced into the salivary sediment system incubated for 1 hour. The five groups were incubated in facultative aerobic environment under 37℃ in the residual hours. The halitosis indexes, VSCs and pH changes were recorded between hours. Results The salivary sediment malodor system can simulate the metabolism of halitosis formation to produce halitosis. The odors of the suspicious halitosis-correlated bacteria introduced groups were higher than the non-halitosis-correlated bacteria and water control group. Conclusion With its simple but fundamental manipulations, incubated whole saliva is a powerful model for study of the metabolism of the oral mixed microbial flora, malodor formation, and other oral diseases-related processes.

[Key words] halitosis; volatile sulphur compounds; salivary sediment malodor system

口腔中微生物的腐化来源于寄生在舌和龈沟中的细菌,这是产生口腔异味的重要原因。Lee等^[1]通

过气相色谱分析等技术检测口臭气体的组成,发现这种气味由挥发性硫化物(volatile sulphur compounds, VSCs)、吲哚、甲基吲哚、胺和脂肪酸组成,它们来源于微生物发酵唾液、血液、鼻腔中的黏液素、龈沟液、溶解的中性白细胞和上皮细胞碎

[收稿日期] 2006-07-05; [修回日期] 2006-10-26

[作者简介] 胡 贇(1979-),男,四川人,住院医师,硕士

[通讯作者] 胡德渝, Tel: 13908034990

屑中的蛋白多肽。其中，VSCs是导致口臭的重要成分，主要由厌氧菌分解食物中的含硫氨基酸产生，包括硫化氢(H₂S)、甲基硫醇(CH₃SH)和乙基硫化物(CH₃SCH₃)等。细菌腐化是产生口臭的主要代谢过程。本研究通过对全唾液标本进行离心，建立一个唾液沉淀物系统的模型，并利用该模型来模拟口腔内口臭的产生。

1 材料和方法

1.1 实验菌株和实验器械

牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌由四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室提供。RC-28S离心机(Dupont公司, 美国), 玻璃电极、离心管、密封小试管、微量加样器(海门舒康公司), MM-1微型振荡器(江苏金城公司), Halimeter口气测量仪(Interscan公司, 美国), 数字pH测量仪(Orion公司, 美国), 三气培养箱(上海金钟公司)。

1.2 实验对象

选取四川大学华西口腔医学院10名学生为实验对象, 其中男性5名, 女性5名, 年龄22~27岁。纳入标准为: 无全身系统疾病、3个月内未服用抗生素、半年内无牙周治疗史、牙周探诊深度在3 mm以下、无探诊出血、无牙周附着丧失、鼻闻法臭味指数为零、Halimeter仪器检测VSCs的体积分数小于 2×10^{-7} 。

1.3 标本的采集

要求10名学生禁食12 h, 并且24 h没有进行口腔清洁措施, 在早上同一时间通过咀嚼石蜡收集每名学生的刺激性全唾液1份, 每份10 mL, 共10份。将所收集的全唾液置于无菌离心管离心后, 吸出部分上清液, 使上清液和沉淀物的比例为2:1。振荡均匀后将每份分成6组孵育混合物, 每组750 μ L, 由唾液沉淀物16.7%、唾液上清液33.3%和为菌悬液预留的50.0%空间组成, 置于密封小试管内, 低温-20 $^{\circ}$ C保存, 备用。

1.4 口臭研究模型的建立

从每名实验对象的6组孵育混合物中选用1组孵育混合物, 共10组, 在37 $^{\circ}$ C兼性厌氧条件下孵育使其产生臭味, 7 h内每隔1 h分别用鼻闻法检测气相(直接鼻闻)和液相(用玻璃棒蘸取后鼻闻)的臭味指数, 用不连续的分级记录臭味程度, 臭味的程度分为0~4度, 其中0为无气味; 1为很难闻到气味; 2为轻微不愉快气味; 3为中度不愉快气味; 4为强烈刺鼻的气味。用Halimeter仪器测量VSCs水平, 用玻璃电极和数字pH测量仪测量pH值

1.5 细菌对臭味产生影响的测定

将实验对象离心全唾液剩下的5组孵育混合物经1 h孵育后, 分别加入可疑致臭菌(牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌)菌悬液50.0%(浓度为每毫升 1×10^6 CFU)以及作为对照的非致臭菌(伴放线放线杆菌)菌悬液50.0%(浓度为每毫升 1×10^6 CFU)和蒸馏水50.0%, 分别为牙龈卟啉单胞菌组、中间普氏菌组、具核梭杆菌组、伴放线放线杆菌组和蒸馏水组。然后继续在37 $^{\circ}$ C兼性厌氧条件下孵育, 在余下的6 h内每隔1 h分别用鼻闻法检测气相和液相的臭味指数, 用Halimeter测量VSCs水平, 用数字pH测量仪测量pH值。

1.6 统计学分析

所得的数据用Excel录入计算机, 采用SPSS 11.0统计软件进行统计处理与分析。

2 结果

2.1 口臭研究模型的测量结果

鼻闻法测量结果显示测得的10组孵育物每小时臭味指数比较接近, 随时间呈上升趋势。液相臭味指数在2 h时开始上升, 在3~5 h的平台期后, 在6 h时上升至2, 其后保持稳定。气相臭味指数在5 h时与液相口臭指数相等, 而其余时间均低于液相口臭指数, 它从4 h时开始上升至1后便保持稳定(图1)。

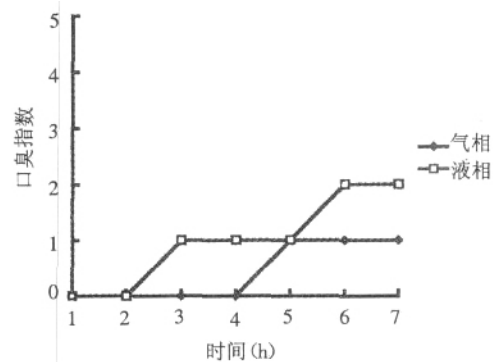


图1 口臭研究模型中气相和液相臭味指数变化

Fig 1 Changes in gaseous-phase odor and liquid-phase odor in the salivary sediment malodor system

口臭研究模型中VSCs的体积分数见图2。孵育混合物中来自离心全唾液沉淀物的细菌可以利用全唾液上清液中的底物, 发生腐化, 生成VSCs, 从而使臭味产生, 随着时间的变化, VSCs生成的量逐渐增加。用玻璃电极和pH测量仪测得的每小时孵育物pH值基本无变化, 接近于7。

2.2 口臭模型中加入细菌后的测量结果

加入细菌后各组气相和液相口臭指数的增加值见表1。每组液相口臭指数增加值均高于气相口臭指数增加值, 加入不同细菌菌悬液口臭模型检测

到的臭味指数增加不同，经单因素方差分析，4组间臭味指数增加值的差别有统计学意义(P<0.05)。其中，加入牙龈卟啉单胞菌组的气相和液相口臭指数增加值最大，而加入伴放线放线杆菌组增加值最小。加入不同细菌菌悬液各组与蒸馏水组比较，经q检验显示，除伴放线放线杆菌组外，其余3组均表现有统计学意义(P<0.05)。

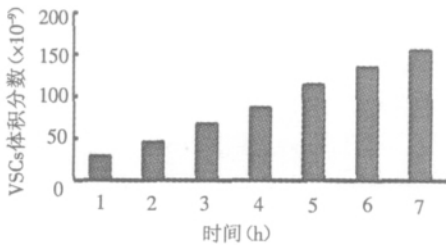


图 2 口臭研究模型中VSCs的体积分数

Fig 2 The volume fraction of VSCs in the salivary sediment malodor system

表 1 加入细菌后各组气相和液相口臭指数的增加值 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes of gaseous-phase odor index and liquid-phase odor index in the salivary sediment malodor system of the five test groups n=10, $\bar{x} \pm s$

组别	口臭指数增加值	
	气相	液相
牙龈卟啉单胞菌组	2.90 ± 0.32	3.90 ± 0.32
具核梭杆菌组	2.10 ± 0.32	3.20 ± 0.42
中间普氏菌组	1.90 ± 0.32	3.10 ± 0.32
伴放线放线杆菌组	1.10 ± 0.32	2.20 ± 0.42
蒸馏水组	1.10 ± 0.32	2.10 ± 0.32

加入不同细菌菌悬液口臭模型中VSCs的增加值也有所不同，牙龈卟啉单胞菌组、具核梭杆菌组、中间普氏菌组、伴放线放线杆菌组和蒸馏水组中VSCs增加值分别为(5.948 0 ± 0.882 8) × 10⁻⁷、(3.800 0 ± 0.463 0) × 10⁻⁷、(3.951 0 ± 0.569 8) × 10⁻⁷、(1.235 0 ± 0.192 9) × 10⁻⁷、(1.239 0 ± 0.192 5) × 10⁻⁷。其中加入牙龈卟啉单胞菌组增加最多，与其余各组相比存在统计学差异(P<0.05)。各组VSCs的增加值与蒸馏水组比较，除伴放线放线杆菌组外，其余均显示有统计学差异(P<0.05)。

3 讨论

3.1 口臭的产生

在绝大多数情况下，口臭来源于口腔内的微生物(主要是革兰阴性厌氧菌)对含硫氨基酸腐分解的结果，口腔气体中的VSCs和口臭的形成有密切关系^[2]。VSCs的口腔来源主要是龈沟(牙周袋)及舌背。

以往认为口臭常伴有牙周病，并且随着牙周袋的加深而增加，牙周病患者口气中的VSCs明显高于牙周健康者，牙周袋是产生VSCs的重要部位。但是有研究发现，口臭、VSCs水平和牙周病没有明显相关性，很多有口臭的人，牙周是健康的，舌是产生口臭的主要部位^[3]。口臭及VSCs水平可以通过刷牙、刷舌背、咀嚼运动以及用抗菌药物含漱而降低，主要是通过减少细菌的量来减少VSCs的产生，细菌的量是口臭形成的重要原因^[4-5]。

3.2 口臭研究模型的建立

全唾液经离心分成沉淀物和上清液，对这2部分的检查可判断它们各自在臭味形成过程中所起的作用。当二者单独孵育时，沉淀物可产生一些臭味，而上清液几乎不产生。但二者混合一起孵育时，就可产生明显的臭味。表明沉淀物提供了产生臭味所必须的细菌以及使臭味能够产生的少量底物^[6]。上清液里含有使沉淀物中的细菌产生臭气所需要的绝大部分底物。这些有气味的产物是口臭的主要成分。

全唾液在口臭产生中必须的主要成分之一是其中的混合细菌，这些细菌绝大部分是口腔内的常驻菌，其中许多附着于上皮鳞屑，很容易并不断地从口腔软组织表面脱落。第2种主要成分是从各唾液腺分泌的唾液，加上脱落的细菌和上皮细胞。根据牙龈炎症的程度，全唾液中也可能有来自龈沟和牙周袋内的液体存在。本研究在体温下孵育全唾液，发现在不同时间段所产生的臭味和从人口腔中挥发出来的臭味相类似。由于在刺激性全唾液的收集过程中，只有少量的细菌从口腔表面脱落、分离出来。离心后的唾液沉淀物约占全唾液的0.5%~2.0%，而更合适的模拟则需要约10%或更多的量。因此，本研究将全唾液离心后加入减量的唾液上清液重组成沉淀物，这样使得细菌的浓度达到合适的水平。同时，为了保证重复性，做到以下2点：1)全唾的收集在早上同一时间，禁食至少12h，24h内没有进行口腔清洁；2)控制细菌浓度，因为它对细菌的生物反应速度有较大的影响。实验将离心后的唾液沉淀物的量调整到16.7%，该浓度在葡萄糖浓度对菌斑糖酵解的作用的体内和体外实验^[6]中得到验证，可提供与体内菌斑糖酵解类似的细菌浓度。

本研究中对口臭研究模型的测量结果显示，模型在37℃兼性厌氧孵育下，7h内口臭值有明显改变，呈上升趋势，证明了其内有足够的细菌和底物即含硫氨基酸，细菌能利用、分解该底物，从而产生臭味。研究结果验证了模型产生口臭的效果，可作为一个研究口臭产生的模型。而且，由于该模型

可在体外模拟口臭在体内的代谢过程,操作也简便易行,出于保护人体和节省费用的考虑,模型对于新的抑制口臭的除臭剂等药物,在临床实验和昂贵的临床研究开始之前的实验也有不错的应用前景。

3.3 口臭研究模型应用于致臭菌的确定

厌氧性致病菌在致口臭形成中起重要作用^[7]。福赛斯拟杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌以及栖牙密螺旋体都属于革兰阴性厌氧菌,能够利用细菌底物生成VSCs,为可疑致臭菌^[8],而伴放线放线杆菌不能在体外产生VSCs,为非致臭菌。由于福赛斯拟杆菌和栖牙密螺旋体在人工培养基和组织培养基上不易生长,因此本研究选用牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌来进行实验。从最终的臭味指数和VSCs指数增加值可以看出,由于加入细菌造成的微生物负载的不同,各组的增加值不完全相同,牙龈卟啉单胞菌组增加最为明显,具核梭杆菌组和中间普氏菌组其次,显示牙龈卟啉单胞菌组有最强的致臭能力,牙龈卟啉单胞菌的加入造成了臭味的明显增加,这与其临床口臭患者高检出率一致,验证了其高致臭性。

口腔内的微生态群落是大量细菌的混合物,过去的单一微生物纯培养,相对来说菌种单一,过于简单,研究过程不能模拟口腔内复杂的代谢过程。而本实验采用的口臭研究模型,由于采集自唾液,与口腔内的细菌组成相似,可弥补这一缺点。仅仅通过在模型中加入一种或几种选择性的纯种细菌,就可以对其在口腔内的混合微生物环境中,特异的在臭味形成过程中的作用进行检验,比起口腔内实验来说也容易得多。需要注意的是,虽然口臭模型

细菌组成与口腔内细菌一致,但口腔内环境相对来说,远比该模型复杂得多,而且口臭的形成原因还包括全身性的其他因素。模型不可能完全模拟口臭的体内代谢过程,这就需要将实验结果与临床检验相结合,以期得到准确的结果。而且,需要进一步的研究来探明口臭的发生机制,改进这一模型,设定新的实验参数,更好地发挥这一模型口臭研究作用。

[参考文献]

- [1] Lee CH, Kho HS, Chung SC, et al. The relationship between volatile sulfur compounds and major halitosis-inducing factors[J]. J Periodontol, 2003, 74(1):32-37.
- [2] Roldan S, Herrera D, Sanz M. Biofilms and the tongue: Therapeutic approaches for the control of halitosis[J]. Clin Oral Investig, 2003, 7(4):189-197.
- [3] Quirynen M, Zhao H, van Steenberghe D. Review of the treatment strategies for oral malodour[J]. Clin Oral Investig, 2002, 6(1):1-10.
- [4] Scully C, Porter S, Greenman J. What to do about halitosis[J]. BMJ, 1994, 308(6923):217-218.
- [5] Yaegaki K, Sanada K. Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients[J]. J Periodontol, 1992, 63(9):783-789.
- [6] Tonzetich J, McBride BC. Characterization of volatile sulphur production by pathogenic and non-pathogenic strains of oral Bacteroides[J]. Arch Oral Biol, 1981, 26(12):963-969.
- [7] Miyazaki H, Sakao S, Kato Y, et al. Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population[J]. J Periodontol, 1995, 66(8):679-684.
- [8] Bernie KM. The causes and management of oral malodor[J]. Dent Today, 2002, 21(2):92-97.

(本文编辑 王 晴)

第6届全国儿童口腔医学学术会议征文

中华口腔医学会儿童口腔医学专业委员会决定,报经中华口腔医学会批准,哈尔滨医科大学口腔医学院承办,拟于2008年1月4—6日在哈尔滨召开第6届全国儿童口腔医学学术会议。现开始征文。

征文内容:1)儿童龋病的临床和基础研究;2)儿童牙髓病的临床和基础研究;3)儿童牙、颌、颌、面生长发育及咬合诱导方面的研究;4)儿童牙外伤的临床和基础研究;5)儿童牙病的流行病学研究;6)口腔治疗中的儿童行为管理和镇静技术。

征文要求:稿件全文(不超过3000字)及中文摘要(不超过400字)各1份,论文撰写格式请参照《中华口腔医学杂志》的投稿要求。

来稿请发送到:E-mail:pediatricdent@sina.com(邮件请命名为:第6届全国儿童牙病会议稿件;稿件请以附件的形式发送)。咨询电话:0451-53646244。

中华口腔医学会儿童口腔医学专业委员会
第6届全国儿童口腔医学学术会议筹备组