

对氨基苯甲酸对牙龈卟啉单胞菌 细胞形态影响的扫描电镜观察

王志凌 肖晓蓉 周学东 彭雪梅 廖运茂

【摘要】目的 观察不同浓度对氨基苯甲酸(PABA)对牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)菌体形态和黏附能力的影响,从而探讨血链球菌(*S. sanguis*)在龈下菌斑微生态平衡中的作用。方法 用1/2浓度的BHI培养基为实验培养基,分别加入不同质量浓度的PABA,对*P. gingivalis*进行常规培养,并对培养出的菌细胞做扫描电镜观察。结果 过高或过低质量浓度的PABA均影响*P. gingivalis*的菌体形态,并对其黏附产生影响。结论 *S. sanguis*产生的PABA影响*P. gingivalis*的菌体形态和黏附能力,提示*S. sanguis*对龈下菌斑的微生态平衡具调节作用。

【关键词】 对氨基苯甲酸; 牙龈卟啉单胞菌; 扫描电子显微镜; 黏附

Scanning Electron Microscope Observation of Morphological Influence P-aminobenzoic Acid (PABA) on *Porphyromonas gingivalis*

WANG Zhiling*, XIAO Xiaorong, ZHOU Xuedong, et al. (*Dental Care Center, Shenzhen Central Hospital for the Chinese People's Armed Police Forces, Shenzhen 518029, China)

【Abstract】 Objective In order to investigate the effect of PABA produced by *Streptococcus sanguis* on microecological balance of subgingival plaque, different concentrations of PABA were applied to see if it can influence the form and adherence of *P. gingivalis*. **Methods** After adding different concentrations of PABA into 1/2 concentration of BHI media, an anaerobic technique was used to culture *P. gingivalis*. *P. gingivalis* grew in the medium was observed by a scanning electron microscope. **Results** Excessively high or low PABA concentration could influence the form and adherence of *P. gingivalis*. **Conclusion** PABA produced by *Streptococcus sanguis* can affect the form and adherence of *P. gingivalis*. It indicates that *Streptococcus sanguis* plays regulative effect on the microecological balance of subgingival plaques.

【Key words】 para-aminobenzoic acid; *Porphyromonas gingivalis*; scanning electron microscope; adherence

血链球菌(*Streptococcus sanguis*, *S. sanguis*)是口腔正常菌群之一,也被视为牙周的有益菌。已有研究证实其合成的生长因子对氨基苯甲酸(para-aminobenzoic acid, PABA)在龈上菌斑的微生态平衡中起着调节作用,是牙菌斑的重要生态调节因子¹⁻³,但其在龈下菌斑的生态调节作用尚未见报道。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是慢性成人牙周炎龈下菌斑中主要的优势菌,其数量和毒力的变化可影响龈下菌斑的微生态平衡。本研究的目的在于探讨PABA对*P. gingivalis*菌体形态和黏附能力的影响,以便深入了解*S. sanguis*在龈下菌斑中的

生态调节作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

P. gingivalis 模式株 ATCC 33277(口腔生物医学工程教育部重点实验室提供);BHI培养基⁴(上海生物制品鉴定所生产);PABA(AR级)(北京芳草医药公司),用10倍系列稀释法配制成质量浓度为1、10、100 mg/L的PABA实验溶液;25%戊二醛(北京益利精细化学品有限公司),配制成2.5%的溶液备用;乙酸正戊酯(AR级)(北京化工厂);无水乙醇(成都金山化工试剂厂),用系列稀释法将其配制成浓度为40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液。

AMRAY-1000B型扫描电子显微镜(中国科学院科学仪器厂组装)。

1.2 实验菌株培养

选择*P. gingivalis*模式株 ATCC 33277作为实验菌株。复苏实验菌冻干株接种于BHI-S血琼脂平板上,在37℃厌氧(80%N₂、10%CO₂、10%H₂)培养48 h,其纯培养物被接种于BHI-S血琼脂平板上厌氧培养48 h,经鉴定后的培养物用pH

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号39670785)

作者单位:518029 武警广东公安边防总队深圳中心医院口腔医疗中心(王志凌),口腔生物医学工程教育部重点实验室(肖晓蓉、廖运茂),四川大学华西口腔医学院口腔内科学教研室(周学东),四川大学法医学院电镜室(彭雪梅)

7.2的0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液配成细菌悬液(12×10^{12} CFU/L)备用。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计 取无菌的10 ml 螺旋管4个:实验管3个、阳性对照管1个。将厚度为0.2 mm的盖玻片切割成边长为0.5 cm的正方形,清洗干净、消毒灭菌后备用。按表1所述在实验管或对照管中分别加入已制备好的盖玻片、BHI培养基、PABA 稀释液、菌悬液或DH₂O,最后放置于37 厌氧培养箱内(80 %N₂、10 %CO₂、10 %H₂)培养48 h⁵。PABA 质量浓度:1号为1 mg/L,2号为10 mg/L,3号为100 mg/L。

表1 细菌培养

Tab 1 Bacterial cultures

管号	BHI 培养基 (ml)	PABA (ml)	菌悬液 (μl)	DH ₂ O (ml)	盖玻片 (片)
1	2	2	100	-	1
2	2	2	100	-	1
3	2	2	100	-	1
对照	2	-	100	2	1

1.3.2 扫描电镜观察 经形态学和生化试验确定为 *P. gingivalis* 纯培养物后,取出螺旋管中的盖玻片,用 PBS 缓冲液清洗后放入2.5%的戊二醛溶液中固定2 h,然后将盖玻片再次用 PBS 缓冲液清洗,随后依次放入40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液中进行梯度脱水(脱水15 min)。最后盖玻片被放入100%乙酸正戊酯溶液中做置换处理25 min,并在CPD030型CO₂临界点干燥机中进行CO₂临界点干燥,最后喷金,用AMRAY-1000B型扫描电子显微镜观察⁶。

2 结 果

2.1 PABA 对 *P. gingivalis* 黏附能力的影响

在4个实验管的盖玻片上均有 *P. gingivalis* 黏附生长,但存在一定差异。从图1,2可见,在对照管,1号实验管和2号实验管中 *P. gingivalis* 黏附在盖玻片上的数量较多,菌细胞分散呈单个生长;而在3号实验管中 *P. gingivalis* 在盖玻片上的黏附数量较少,而且细菌之间相互集聚呈链状生长。

2.2 PABA 对 *P. gingivalis* 菌体形态的影响

从图3~6可见,在对照管和2号实验管中菌细胞的形态规则,边缘光滑呈球杆状,为 *P. gingivalis* 的正常菌体形态;而在1号实验管中 *P. gingivalis* 的菌体形态开始出现变异,菌细胞体积增大,菌体拉长,边缘锐利呈短杆状;3号实验管中 *P. gingivalis* 的菌体形态则普遍出现较大变异,有长杆状、短杆状、凹陷状和不规则状,甚至菌体崩解。

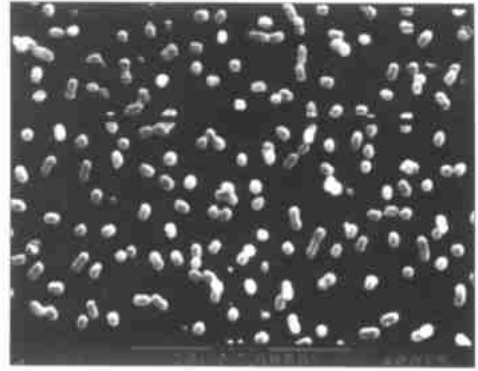


图1 1号实验管(1 mg/L), *P. gingivalis* 菌细胞黏附数量较多,菌细胞多为分散状单个生长,链状生长较少 SEM ×5 000

Fig 1 *P. gingivalis* grown in the medium containing 1 mg/L PABA, the number of *P. gingivalis* adhere to glass slice was more and the cell grew dispersedly SEM ×5 000

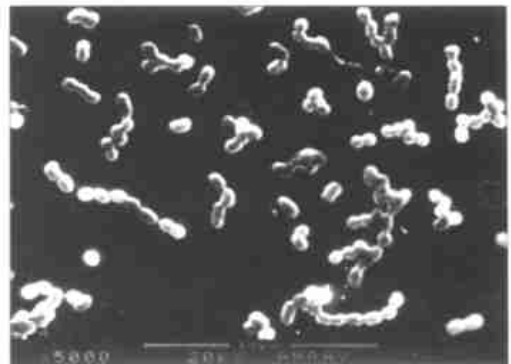


图2 3号实验管(100 mg/L), *P. gingivalis* 菌细胞黏附数量较少,菌细胞相互黏附呈链状排列 SEM ×5 000

Fig 2 *P. gingivalis* grown in medium containing 100 mg/L PABA, the number of *P. gingivalis* adhered to glass slice was small and the cells grew together as chains of cells SEM ×5 000

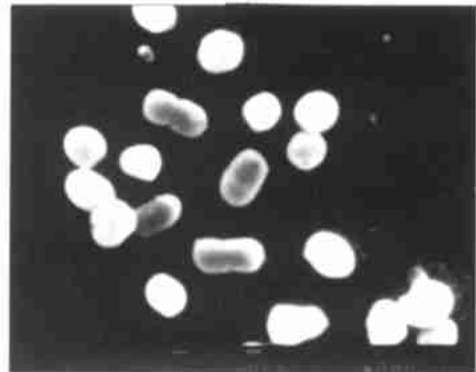


图3 对照管,形态规则边缘光滑呈圆形或为 *P. gingivalis* 的正常菌细胞形态 SEM ×20 000

Fig 3 *P. gingivalis* grown in the medium without any PABA, the cells of *P. gingivalis* appeared to be coccobacillary whose forms were regular and brim were slippery SEM ×20 000

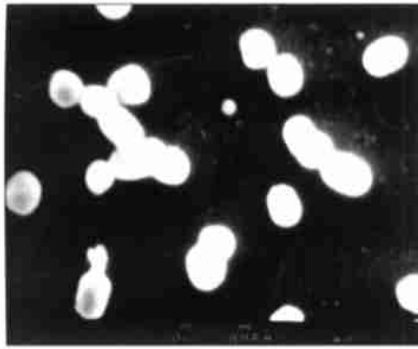


图4 2号实验管(10 mg/L), *P. gingivalis* 菌细胞形态规则边缘光滑呈圆形或为 *P. gingivalis* 的正常菌细胞形态 SEM × 20 000

Fig 4 *P. gingivalis* grown in the medium containing 10 mg/L PABA, the cells of *P. gingivalis* appeared to be coccobacillary whose forms were regular and brim were slippery SEM ×20 000

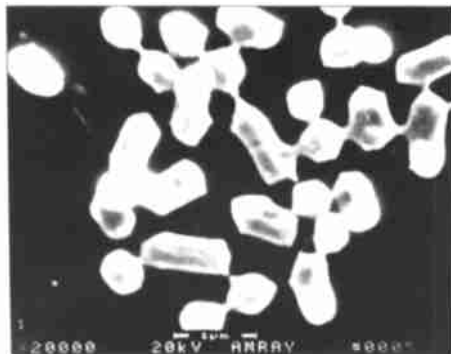


图5 1号实验管(1 mg/L), *P. gingivalis* 菌细胞变异菌细胞拉长, 边缘锐利呈短杆状 SEM × 20 000

Fig 5 *P. gingivalis* grown in the medium containing 1 mg/L PABA, the cells of *P. gingivalis* appeared to be slight abnormality as their forms became bigger and longer with sharp brim SEM ×20 000

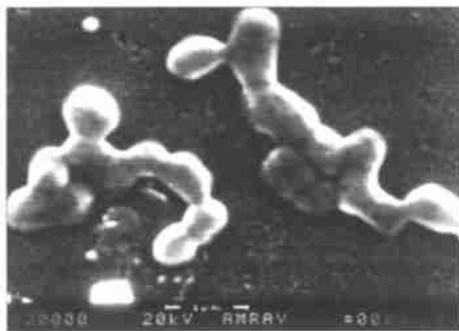


图6 3号实验管(100 mg/L), *P. gingivalis* 菌细胞形态出现变异, 部分细胞呈凹陷状和不规则状, 甚至菌体崩解 SEM × 20 000

Fig 6 *P. gingivalis* grown in the medium containing 100 mg/L PABA, the cells of *P. gingivalis* appeared to be widely damaged with the forms of hort rods, long rods, excavation and irregularity SEM ×20 000

3 讨 论

S. sanguis 是最早定植于口腔中的微生物之一,

在龋病和牙周病的发生发展过程中均占有十分重要的位置。*S. sanguis* 可合成一种微生物的生长因子 PABA^{1,2}, 而 PABA 不但影响龈上菌斑的主要致龋菌变形链球菌的生长³, 而且对龈下菌斑的主要牙周可疑病原菌 *P. gingivalis* 也有影响。本课题组有关 BAPA 对 *P. gingivalis* 生长的影响研究发现, 在其质量浓度为 1 mg/L 时促进细菌生长的能力最强, 随着浓度的增加细菌的生长能力有逐渐降低的趋势⁷, 这提示 PABA 在牙菌斑的微生态平衡中具有调节作用, 它可作为牙菌斑的生态调节因子。研究还发现不仅微生物数量的变化可导致牙菌斑的微生态失调, 其代谢状况的改变也是牙菌斑微生态失调的一个重要因素。微生物代谢状况的改变可表现为其菌体形态、黏附能力和代谢产物(如各种毒素、侵袭性酶)质和量的改变。关于生长因子 PABA 对微生物生长影响的报道较多^{8~10}, 但对微生物形态和黏附能力影响的报道却很少。本实验对 *P. gingivalis* 在含不同质量浓度 PABA 的培养基中生长后的菌体形态和黏附情况进行了扫描电子显微镜观察, 结果显示与对照管相比 PABA 质量浓度在 10 mg/L 时 *P. gingivalis* 的菌体形态未见明显变化; 但其质量浓度为 1 mg/L 和 100 mg/L 时, *P. gingivalis* 的细胞排列和菌体形态均发生变化; 特别是质量浓度在 100 mg/L 时 *P. gingivalis* 的菌体形态发生较大改变, 部分细胞呈凹陷状和不规则状, 甚至菌体崩解; 从扫描电镜观察可见 PABA 对 *P. gingivalis* 的黏附影响, 当 PABA 质量浓度为 1 mg/L 和 10 mg/L 时对 *P. gingivalis* 的黏附无影响; 而 *P. gingivalis* 在 PABA 质量浓度为 100 mg/L 的培养基中生长后, 对盖玻片的黏附能力减弱, 但菌细胞之间的集聚却有所增强。

生长因子是微生物生长代谢所必需的, 但微生物自身不能合成, 必须由外源供给有机化合物。其种类较多, 包括各种维生素、氨基酸、嘌呤、嘧啶、脂肪酸、膜的其他成分等¹¹。PABA 是氨基芳香酸类维生素, 也是 B 族维生素的一种, 被称为维生素 B_x。微生物可利用 PABA 合成叶酸, 而后者是“一碳单位”的载体, 参与生命的正常代谢, 因此 PABA 是微生物的生长因子¹²。生长因子既然参与微生物的代谢, 那么其含量的变化必然对微生物的代谢状况产生影响, 并促使其形态产生改变。Mckee 等¹³ 在研究另一种生长因子氯化血红素(hemin)对 *P. gingivalis* 形态的影响时发现, 在培养基中加入不同浓度的 hemin 会导致 *P. gingivalis* 的菌体表面超微结构发生变化。当 hemin 充足时 *P. gingivalis* 菌体表面菌毛的数量大大

增加,但细胞膜泡的数量却减少;而在 hemin 不足时情况恰恰相反, *P. gingivalis* 的菌毛数量减少但细胞膜泡却大量增加,于是推测当生长因子不足而影响细菌的正常代谢时, *P. gingivalis* 可改变菌体形态以便于获取更多的生长因子。可见生长因子过多或过少均可使细菌的代谢发生改变,代谢过程不协调,进而导致细菌生长状况不稳定,甚至死亡、崩解,最终表现为菌体的形态产生变化。笔者的实验也表明培养基中 PABA 的质量浓度为 10 mg/L 是 *P. gingivalis* 稳定生长的最适量,过多或过少均可能影响 *P. gingivalis* 的菌体形态。当然,对 PABA 浓度在 100 mg/L 和 1 mg/L 时, *P. gingivalis* 细胞形态变化的机理还有待深入探讨,特别是在 PABA 浓度为 1 mg/L 时, *P. gingivalis* 细胞形态的变化还难以解释。而 PABA 对 *P. gingivalis* 细胞表面结构如菌毛的影响则需要透射电镜检查。

本实验的另一发现是当 *P. gingivalis* 在含不同质量浓度 PABA 的培养基中生长时对盖玻片的黏附能力也不同,其中在 PABA 为 100 mg/L 的培养基中生长的 *P. gingivalis* 对盖玻片的黏附能力减弱,但菌细胞之间的集聚能力却有所加强。菌毛、细胞外膜和细胞膜泡是 *P. gingivalis* 的主要黏附因子,可诱发细菌间的共聚^{14,15}。PABA 影响 *P. gingivalis* 的黏附和相互之间的集聚也可能提示 PABA 对其菌体表面超微结构菌毛、细胞外膜和细胞膜泡的数量或功能产生影响。然而 PABA 为何减弱 *P. gingivalis* 对盖玻片的黏附但却加强菌细胞相互之间的共聚还需进行深入研究。

牙菌斑是一个复杂的生态平衡体系,这种平衡的破坏是龋病和牙周病的始动因子。*P. gingivalis* 是慢性成人牙周炎龈下菌斑最主要的病原菌,其菌细胞的形态和黏附能力的改变对龈下菌斑的微生物生态平衡具有影响。血链球菌产生的 PABA 影响 *P. gingivalis* 的菌体形态和黏附能力,提示血链球菌对龈下菌斑微生物生态平衡具有调节作用。

牙周病是最常见的牙齿及周围支持组织疾病之一,龈下菌斑微生物生态平衡失调是引起其发生的始动因子,因此通过调节和维护龈下菌斑微生物生态平衡成为防治牙周病的新途径。*S. sanguis* 是龈下菌斑的主要微生物之一,了解其在龈下菌斑微生物生态平衡中确切的地

位和作用,将有助于对牙周病的生态防治。有关 *S. sanguis* 和其产生的 PABA 对 *P. gingivalis* 的主要毒力因子和代谢产物的影响情况有待进一步研究。

参考文献

- 1 Carlsson J. Nutritional requirements of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in mixed culture. Arch Oral Biol, 1971, 16 (8): 963-965
- 2 Zhou XD, Hu T, Zhang P, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic measurement of the P-aminobenzoic acid synthesized by *Streptococcus*. Clin J Dent Res, 1998, 1(2): 37-40
- 3 郭斌,周学东,肖晓蓉. 对氨基苯甲酸对变形链球菌生长的影响. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(5): 312-314
- 4 李德懿编著. 牙周病微生物学. 天津:天津科技翻译出版公司, 1994: 226
- 5 肖晓蓉主编. 口腔微生物学及实验技术. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1993: 130
- 6 王仲涛,雷建章,应国华主编. 组织和细胞扫描电镜图谱. 北京:人民卫生出版社, 1986: 197-208
- 7 肖晓蓉,王志凌,周学东. 对氨基苯甲酸对牙龈卟啉单胞菌生长的影响. 中国微生态学杂志, 2001, 13(6): 331-333
- 8 Magda SB, Charles BP. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin and gentamicin on plasmodium falciparum development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, 1994, 31 (4): 561-565
- 9 Glenn AM, Iltarat I. Auxotrophs of plasmodium falciparum dependent on P-aminobenzoic acid for growth. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(10): 4244-4248
- 10 Gchner T, Badaev SA. Effects of humic acids, para-aminobenzoic acid and ascorbic acid on the N-nitrosation of the carbamate insecticide propoxur and on the mutagenicity of nitrosopropoxur. Mutat Res, 1990, 229(1): 37-41
- 11 陈天寿主编. 微生物培养基的制造与应用. 北京:中国农业出版社, 1995: 21-34
- 12 张乃衡主编. 生物化学. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1999: 145-146
- 13 Mckee AS, Mcdermid AS, Baskerville A. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. Infect Immun, 1986, 52(2): 349-352
- 14 Li J, Ellen RP, Hoovr CI, et al. Association of protease of *Prophyromonas (Bacteroides) gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. J Dent Res, 1991, 70(1): 82-86
- 15 Cimasoni G, Song M, McBride BC. Effect of crevicular fluid and lysosomal enzymes on the adherence of *Streptococci* and *Bacteroides* to hydroxyapatite. Infect Immun, 1987, 55(6): 1484-1489

(2001-04-26 收稿, 2002-10-20 修回)

(本文编辑 王 晴)