

文章编号 1006-8147(2022)03-0310-04

论 著

抗菌肽 RISE-AP12[®] 对钛种植体周围炎主要致病菌和生物膜生长的抑制作用研究

吕金莹, 胡欣, 邓嘉胤

(天津医科大学口腔医学院牙周科, 天津 300070)

摘要 目的: 探讨抗菌肽RISE-AP12[®] 对钛种植体周围炎主要致病菌及其生物膜生长的抑制作用。方法: 调整抗菌肽RISE-AP12[®] 为不同的浓度, 对种植体周围炎主要致病菌具梭核杆菌、血链球菌以及牙龈卟啉单胞菌的菌落进行监测, 观察抗菌肽 RISE-AP12[®] 对主要致病菌的影响, 确定最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC), 绘制抗菌肽 RISE-AP12[®] 作用于3种致病菌的 kill-time 曲线并观察其生物膜的变化。结果: 抗菌肽 RISE-AP12[®] 对血链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具梭核杆菌的 MIC 值分别为 20、10、5 mg/L, MBC 值分别为 35、15、20 mg/L。根据 kill-time 曲线发现, 在 1 MIC 和 2 MIC 时均具有较好的杀菌作用, 2 MIC 的抑菌作用显著强于 1 MIC 与阳性对照组(具梭核杆菌: $t=1.653, 1.763, P=0.013, 0.008$; 牙龈卟啉单胞菌: $t=0.984, 1.271, P=0.005, 0.007$; 血链球菌: $t=1.548, 2.187, P=0.023, 0.002$)。当抗菌肽 RISE-AP12[®] 浓度为 40 mg/L 时, 对生物膜的抑制作用最强, 清除率显著高于阳性对照组(具梭核杆菌: $t=2.768, P=0.032$; 牙龈卟啉单胞菌: $t=0.676, P=0.014$; 血链球菌: $t=0.794, P=0.025$)。结论: 抗菌肽 RISE-AP12[®] 对钛种植体周围炎主要致病菌具梭核杆菌、血链球菌以及牙龈卟啉单胞菌均具有抑制作用, 在一定浓度范围内, 可以破坏其生物膜生长。

关键词 抗菌肽; RISE-AP12[®]; 种植体周围炎; 致病菌; 生物膜

中图分类号 R781.05

文献标志码 A

Study on the inhibitory effect of antibacterial peptide RISE-AP12[®] on the main titanium peri-implantitis pathogens and the growth of biofilm

LYU Jin-ying, HU Xin, DENG Jia-yin

(Department of Periodontology, School and Hospital of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of antibacterial peptide RISE-AP12[®] on the main pathogens of titanium peri-implant inflammation and the growth of biofilm. **Methods:** The antimicrobial peptide RISE-AP12[®] was adjusted to different concentrations, the colonies of *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis* and *Porphyromonas gingivalis* were monitored, the effect of antimicrobial peptide RISE-AP12[®] on the main pathogens was observed, and the minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) were determined. The kill-time curves of antimicrobial peptide RISE-AP12[®] on three pathogens were drawn, and the changes of biofilm were observed. **Results:** The MIC values of antimicrobial peptide RISE-AP12[®] against *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* were 20, 10 and 5 mg/L, and the MBC values were 35, 15 and 20 mg/L, respectively. According to the kill-time curve, it was found that both 1 MIC and 2 MIC concentrations had good bactericidal effect, and the bacteriostatic effect of 2 MIC concentration was significantly stronger than that of 1 MIC concentration and positive control group(*Fusobacterium nucleatum*: $t=1.653, 1.763, P=0.013, 0.008$; *Porphyromonas gingivalis*: $t=0.984, 1.271, P=0.005, 0.007$; *Streptococcus sanguis*: $t=1.548, 2.187, P=0.023, 0.002$). When the concentration of antimicrobial peptide RISE-AP12[®] was 40 mg/L, the inhibitory effect on biofilm was the strongest, and the clearance rate was significantly higher than that in the positive control group(*Fusobacterium nucleatum*: $t=2.768, P=0.032$; *Porphyromonas gingivalis*: $t=0.676, P=0.014$; *Streptococcus sanguis*: $t=0.794, P=0.025$). **Conclusion:** Antimicrobial peptide RISE-AP12[®] can inhibit the main pathogenic bacteria of titanium periimplant inflammation, such as *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis* and *Porphyromonas gingivalis*. In a certain concentration range, it can destroy the growth of biofilm.

Key words antimicrobial peptides; RISE-AP12[®]; peri-implantitis; pathogenic bacteria; biofilm

种植体周围炎是指发生在口腔种植体周围软组织的可逆炎症, 是以种植体上的细菌微生物感染为特征的炎性疾病^[1]。目前种植体周围炎的治疗手

段都是基于牙周炎治疗的一般原则, 包括消除细菌微生物群, 防止细菌定植和创造一个能够抑制龈下细菌的生态环境^[2-3]。种植体周围炎的常规治疗手段包括机械治疗和化学药物治疗, 因为机械治疗无法彻底清除粗糙表面的细菌, 再加上抗生素具有较广的抗菌谱, 容易诱发菌群失衡, 所以治疗效果都不

基金项目 天津市自然科学基金重点项目(17JCYBJC26300)

作者简介 吕金莹(1989-), 女, 医师, 硕士在读, 研究方向: 口腔医学;

通信作者: 邓嘉胤, E-mail: jdeng@tmu.edu.cn。

理想^[4]。抗菌肽是生物细胞特定基因编码,是机体抵抗病原微生物时诱导产生的一类带正电荷的防御性小分子多肽,具有稳定性高、抗菌谱广等优点^[5-6]。RISE-AP12[®] 是一种人工合成的新型抗菌肽,具有较好的生物学活性与较强的抗菌作用,且不易产生耐药性,安全性更高,在种植体周围炎的应用中具有较大的优势^[7-8]。本研究旨在探讨分析不同浓度的抗菌肽 RISE-AP12[®] 对钛种植体周围炎主要致病菌和生物膜生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验菌株包括血链球菌(ATCC10556),牙龈卟啉单胞菌(ATCC33277),具核梭杆菌(ATCC10953)。

主要试剂与仪器包括钛种植体(Ti6Al4V,规格:Φ3 mm×7 mm);抗菌肽 RISE-AP12[®] (由北京锐瑟生物医药科技发展有限公司合成提供);电热恒温培养箱(上海跃进 HDPN-II-256 型)、低温离心机(Grows Instrument TGL27A 型)、酶标仪(美国 ThermoFisherScientific)、厌氧培养箱(上海跃进 YQX-II 型)、CO₂ 细胞培养箱(上海龙跃 WJ-3-160T 型)。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽 RISE-AP12[®] 药液的制备 用脑心浸液琼脂(BHI)培养基将抗菌肽培养成浓度为 0.1 g/L 的母液,经针孔滤器过滤消毒后储存于-20℃备用。

1.2.2 实验菌种的复苏与培养 将具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌复苏后接种于 BHI 培养基,37℃下专性厌氧环境培养 48 h,血链球菌复苏后于 37℃下微需氧环境培养 24 h。抽取菌落革兰染色后进行生化鉴定,确认为纯菌无污染后进行传代培养,配制成 2.0×10⁶ CFU/mL 菌悬液保存备用。

1.2.3 检测最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC) 对数生长期的菌液,调整抗菌肽 RISE-AP12[®] 浓度为 40、35、30、25、20、15、10、5、2.5 mg/L。各取 100 μL 菌悬液与药液接种于 96 孔板,置于培养箱中过夜培养观察。置于黑色背景中,若肉眼观察无细菌生长孔清亮且对应的最小用药浓度时即为 MIC 值;当菌落数少于 5~6 个时对应的最低浓度即为 MBC 值^[9]。进行 3 次平行实验。

1.2.4 kill-time 曲线测定与绘制 菌液与药液 1:1 混合后,取 50 μL 用三蒸水稀释 10 倍,取稀释后的 25 μL 进行涂布,置于专性厌氧环境中继续培养 24~48 h。分别检测 1、2 MIC 浓度时的抑菌效果。选取 BHI 培养基+菌悬液为阴性对照,选取 BHI 培养基+复方氯己定漱口水作为阳性对照。以 log CFU/mL 为纵坐标,时间为横坐标,进行 kill-time 曲线的绘制。进行 3 次平行实验。

1.2.5 生物膜制备及分组 将钛片切割研磨后,用无水乙醇与去离子水超声 20 min,超声微弧氧化后,经 3 mol/L 的 NaOH 处理,于 60℃浸泡 1 h,晾干。调节 pH 至 7 时,使用 KH-550 硅烷联剂超声,再浸入硅烷溶液中浸泡 30 s,干燥后待用。收集口腔状况良好、无吸烟史且近期末服用药物的 10 名志愿者唾液,男性 5 名,女性 5 名,平均年龄(40.6±1.6)岁,以 4 500 r/min 离心 30 min 后取上清液,过滤除菌后备用。将钛片消毒后置于唾液中 24 h,形成膜后,转至 24 孔板培养,加入 500 μL 菌液、1 500 μL 培养基,于相应培养环境培养 24~48 h。PBS 冲洗 3 次后于戊二醛固定 24 h,采用梯度酒精洗脱。取出制备的生物膜置于 24 孔板中,分别加入 40、20、10、5、2.5 mg/L 的抗菌肽 RISE-AP12[®]、无菌生理盐水与 0.6 g/L 复方氯己定漱口液的培养基 1 000 μL,制备生物膜。应用酶标仪测定 630 nm 处的 OD 值。生物膜清除率=(药物处理后 OD 值-无菌生理盐水 OD 值)/无菌生理盐水 OD 值×100%。进行 3 次平行实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对本次研究的数据结果进行分析,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两两比较应用 LSD-*t* 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗菌肽 RISE-AP12[®] 对主要致病菌的影响 根据 MIC 和 MBC 定义,判定各致病菌的 MIC 和 MBC,具体数据见表 1。

表 1 抗菌肽 RISE-AP12[®] 对主要致病菌的影响
Tab 1 Effect of antimicrobial peptide RISE-AP12[®] on main pathogenic bacteria

菌种	MIC(mg/L)	MBC(mg/L)
血链球菌	20	35
牙龈卟啉单胞菌	10	15
具核梭杆菌	5	20

注:MIC:最小抑菌浓度;MBC:最小杀菌浓度

2.2 抗菌肽 RISE-AP12[®] 作用种植体周围炎主要致病菌的 kill-time 曲线 kill-time 曲线发现,在 1 MIC 和 2 MIC 时均具有较好的杀菌作用,2 MIC 的抑菌作用显著强于 1 MIC 与阳性对照组(具核梭杆菌: $t=1.653$ 、 1.763 , $P=0.013$ 、 0.008 ;牙龈卟啉单胞菌: $t=0.984$ 、 1.271 , $P=0.005$ 、 0.007 ;血链球菌: $t=1.548$ 、 2.187 , $P=0.023$ 、 0.002),见图 1~3。

2.3 抗菌肽 RISE-AP12[®] 对钛种植体周围炎主要致病菌生物膜的影响 随着抗菌肽 RISE-AP12[®] 的浓度增加,其对具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、血链球菌生物膜的清除率也随之增强。当抗菌肽 RISE-AP12[®] 浓度为 40 mg/L 时,对生物膜的抑制

作用最强,清除率显著高于0.6 g/L 复方氯己定漱口水组(具核梭杆菌: $t=2.768$, $P=0.032$;牙龈卟啉单胞菌: $t=0.676$, $P=0.014$;血链球菌: $t=0.794$, $P=0.025$),见图4~6。

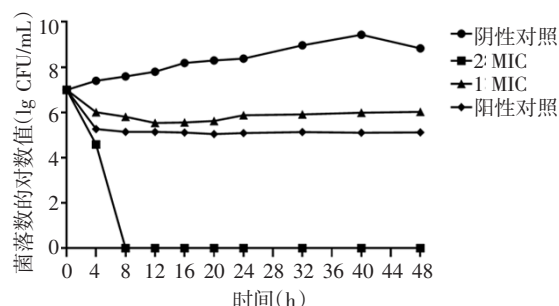


图1 抗菌肽 RISE-AP12® 作用具核梭杆菌的 kill-time 曲线

Fig 1 Kill-time curve of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Fusobacterium nucleatum*

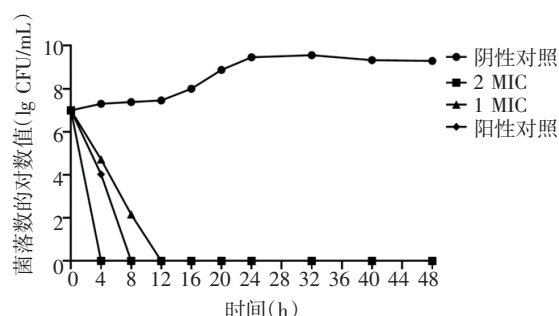


图2 抗菌肽 RISE-AP12® 作用牙龈卟啉单胞菌的 kill-time 曲线

Fig 2 Kill-time curve of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Porphyromonas gingivalis*

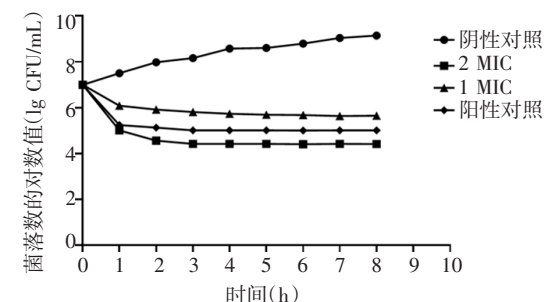
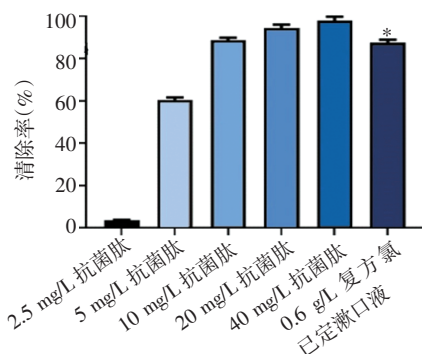


图3 抗菌肽 RISE-AP12® 作用血链球菌的 kill-time 曲线

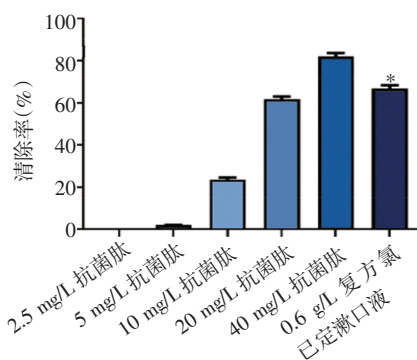
Fig 3 Kill-time curve of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Streptococcus sanguis*



注:与40 mg/L 抗菌肽相比,* $P<0.05$

图4 抗菌肽 RISE-AP12® 对具核梭杆菌生物膜的影响

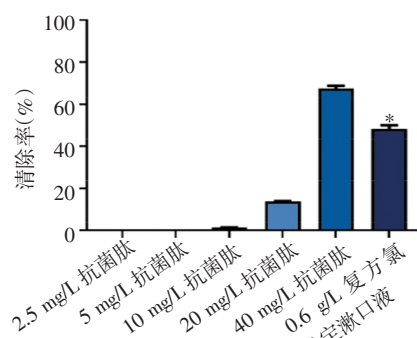
Fig 4 Effect of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Fusobacterium nucleatum* biofilm



注:与40 mg/L 抗菌肽相比,* $P<0.05$

图5 抗菌肽 RISE-AP12® 对牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响

Fig 5 Effect of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Porphyromonas gingivalis* biofilm



注:与40 mg/L 抗菌肽相比,* $P<0.05$

图6 抗菌肽 RISE-AP12® 对血链球菌生物膜的影响

Fig 6 Effect of antimicrobial peptide RISE-AP12® on *Streptococcus sanguis* biofilm

3 讨论

随着种植体的使用量不断增加,种植体周围炎也变得越来越普遍,关于种植体周围炎的病因学研究越来越受到专家学者的关注^[10]。最先认为种植体周围炎发生的原因在于从力学角度出发,认为植入体不能很好负荷咀嚼带来的外力。但是随着研究不断深入,人们发现减少力学因素的影响后并不能减少种植体周围炎的发生。种植体周围炎是慢性发展的过程,骨质进行性破坏,在其发展过程中,菌斑的聚集以及生物膜内部复杂的相互关系与宿主炎症反应的发生、发展密不可分,因此细菌菌落的研究变得越来越热门^[11]。其中,具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、厌氧菌及螺旋体、福赛坦菌、齿垢密螺旋体等被认为是与种植体周围炎发生最为密切的菌落^[12]。在上述众多的细菌库中,血链球菌是最早定植于牙面的一种细菌,在龈上和龈下菌斑中都可检出,可以与多种细菌发生聚集反应^[13]。具核梭杆菌是口腔中常见共生细菌,在生物膜中具有共聚反应,可通过黏附素对各个时期细菌的定植进行整合^[14]。牙龈卟啉单胞菌是导致种植体周围炎的主要致病菌之一,其龈下的定植需要早期定植菌的存在,如链球

菌等。其侵入宿主后可以改变自身基因,抑制中性粒细胞活性,参与生物膜的形成和宿主防御的调节,被认为是重点研究的细菌病原体^[15]。因此,选择上述3种菌种作为本实验的研究对象。

本研究发现,抗菌肽 RISE-AP12® 对具核梭杆菌的 MIC 值最低;对牙龈卟啉单胞菌的 MBC 值最低;而对血链球菌的抑制、杀菌作用相对较弱,这可能是由于血链球菌具有双重特性,其代谢产物对厌氧菌可产生拮抗作用,其 MIC、MBC 值最高,分别为 20、35 mg/L。一般抗菌药物可呈时间依赖性或浓度依赖性具有杀菌或抑菌作用,本研究进一步绘制抗菌肽 RISE-AP12® 作用的时间杀菌曲线。根据抗菌肽 RISE-AP12® 作用于具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌与血链球菌的 kill-time 曲线发现,在 1 MIC 和 2 MIC 时均具有较好的杀菌作用,2 MIC 的抑菌作用显著强于 1 MIC 与阳性对照组,且差异具有统计学意义。较高浓度的抗菌肽 RISE-AP12® 抑菌作用更强。值得注意的是,随着作用时间延长,抗菌效果并没有持续增长,表明抗菌肽的抗菌作用可能为剂量依赖性,而非时间依赖性。

细菌生物被膜是指细菌相互黏附于接触表面,通过分泌的因子将其自身包绕其中而形成的大量细菌聚集膜样物^[16]。细菌生物被膜中的细菌可以采用多种生存策略来逃避宿主的防御,并且拥有着维系共生制衡关系的各种因子,抗菌素想摧毁这样的微生态是相当有难度的^[17-18]。研究发现,随着抗菌肽 RISE-AP12® 的浓度增加,其对具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、血链球菌生物膜的清除率也随之增强,显示出较好的抗菌作用。当抗菌肽 RISE-AP12® 浓度为 40 mg/L 时,对生物膜的抑制作用最强,清除率显著高于 0.6 g/L 复方氯己定漱口液组,且差异具有统计学意义。目前抗菌肽对细菌细胞膜的作用机制仍不完全清楚。目前提出有孔洞学说(the barrel-stave model)、可变“毯”学说(the carpet model)、离子通道学说(the aggregate channel model)。此外,还有很多研究认为,抗菌肽对细菌细胞膜的作用仅是开始,很多抗菌肽对细菌的杀伤作用都伴随着细胞内的一系列反应。很多抗菌肽都能穿过细菌生物膜,分别与细胞内不同组织结合,产生破坏作用,进而实现对于细菌的抑制作用。目前对于抗菌肽 RISE-AP12® 来说,虽得知其有一定抗菌作用,但是其具体机制还需要进一步研究。

综上所述,抗菌肽 RISE-AP12® 可以抑制钛种植体周围炎主要致病菌具核梭杆菌、血链球菌以及牙龈卟啉单胞菌生长,同时可以抑制生物膜生长,从而控制钛种植体周围炎的发生。

参考文献:

- [1] FRAGKIOUDAKIS I, TSELEKI G, DOUFEXI A E, et al. Current concepts on the pathogenesis of peri-implantitis: a narrative review[J]. Eur J Dent, 2021, 15(2): 379-387.
- [2] NIE J, ZHANG Q, ZHENG H, et al. Pyrosequencing of the subgingival microbiome in peri-implantitis after non-surgical mechanical debridement therapy[J]. J Periodontol Res, 2020, 55(2): 238-246.
- [3] PRANNO N, CRISTALLI M P, MENGONI F, et al. Comparison of the effects of air-powder abrasion, chemical decontamination, or their combination in open-flap surface decontamination of implants failed for peri-implantitis: an ex vivo study[J]. Clin Oral Investig, 2021, 25(5): 2667-2676.
- [4] GENG H, YUAN Y, ADAYI A, et al. Engineered chimeric peptides with antimicrobial and titanium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 82: 141-154.
- [5] GODOY-GALLARDO M, MAS-MORUNO C, YU K, et al. Antibacterial properties of hlf1-11 peptide onto titanium surfaces: a comparison study between silanization and surface initiated polymerization[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(2): 483-496.
- [6] HOYOS-NOGUES M, BROSEL-OLIU S, ABRAMOVA N, et al. Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86: 377-385.
- [7] 董颖韬, 贾斌. 抗菌肽 RISE-AP12 联合中药汤剂对种植体周围牙龈沟液炎症因子的影响[J]. 临床研究, 2017, 26(11): 60-62.
- [8] 谢丽敏, 刘丹丹, 宗菲. 不同浓度的抗 RISE-AP12 对外培养成骨细胞生物活性的影响[J]. 口腔医学, 2017, 37(2): 115-120.
- [9] 费涛, 李冀寅, 王一字, 等. 富含色氨酸抗菌肽对种植体周围炎主要致病菌生长抑制作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(2): 156-158, 168.
- [10] IOANNIS K, CHANTAL P, ALESSANDRO P, et al. Peri-implant diseases: diagnosis, clinical, histological, microbiological characteristics and treatment strategies. a narrative review[J]. Antibiotics, 2020, 9: 835.
- [11] FRANCESCO A, ANDREI C I, MARCO O, et al. Biofilm formation on dental implant surface treated by implantoplasty: an in situ study[J]. Dent J, 2020, 8: 40.
- [12] LIYM A, XIANG Q, ZHANG Q H, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application[J]. Peptides, 2012, 37(2): 207-215.
- [13] KRUNAL N, MUKTA K, OWEN A, et al. Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces[J]. Dental, 2015, 9: 11.
- [14] KEISUKE N, MIDORI S, TAICH I T, et al. Hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis recondition biofilm-contaminated titanium surfaces for subsequent osteoblastic cell proliferation[J]. Sci Rep, 2019, 9: 4688.
- [15] CASEY C, PINGHUI F, JØRGEN S, et al. Herpesvirus-bacteria synergistic interaction in periodontitis[J]. Periodontol, 2000, 2020, 82: 42-64.
- [16] FRANCESCO C, DORINA L, CARLO A B, et al. A new strategy against peri-implantitis: antibacterial internal coating[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 3897.
- [17] VESTB Y L, TORSTEIN G, ROGER S, et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease[J]. Antibiotics, 2020, 9(2): 59.
- [18] BELIBASAKIS G N, MANOIL D. Microbial community-driven e-tiopathogenesis of peri-implantitis[J]. J Dent Res, 2021, 100(1): 21-28.

(2021-10-08 收稿)