

文章编号 1006-8147(2023)05-0507-07

论著

褪黑素联合盐酸米诺环素对牙周致病菌混合生物膜的抑制作用

杨雨晴¹, 叶静², 刘青¹, 阙克华¹, 张溪¹, 刘颖¹

(1.天津医科大学口腔医院牙体牙髓科, 天津 300070; 2.天津市天津医院口腔科, 天津 300211)

摘要 目的:探究褪黑素与盐酸米诺环素联合使用对牙周致病菌混合生物膜的抑制作用,探索牙周抗菌斑药物治疗的新方法。方法:通过微量液体稀释法分别测定褪黑素和盐酸米诺环素对牙周主要致病菌,戈登链球菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),应用微量棋盘稀释法检测药物联合应用对各致病菌的抑菌浓度分数指数(FICI),采用结晶紫染色法评估药物联合应用对单菌及混合菌生物膜的影响。应用激光共聚焦扫描显微镜评估药物联合应用对混合菌生物膜的抑制及离散作用。结果:褪黑素对戈登链球菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌均具有显著抑制作用,其MIC值均为1%,MBC值均为2%;对上述混合菌的MIC值为2%,MBC值为4%。褪黑素联合盐酸米诺环素对牙龈卟啉单胞菌和伴放线聚集杆菌生长的抑制表现为协同作用,对戈登链球菌、具核梭杆菌和混合菌悬液均表现为相加作用。与对照组相比,褪黑素与盐酸米诺环素联合应用可显著提高对牙周各致病菌和混合菌种生物膜的抑制和离散效果,其中实验组浓度为1%+1/2MIC时,对单菌种和混合多菌种生物膜的抑制作用提高最显著($P<0.05$),当药物浓度为1%+MIC时,对生物膜的离散作用增长最显著($P<0.05$),其抑制和清除效果均高于单独应用浓度为2MIC的盐酸米诺环素。结论:褪黑素联合盐酸米诺环素可显著提高对牙周致病菌斑生物膜的抑制能力,有望在牙周炎的辅助治疗中发挥作用。

关键词 褪黑素;盐酸米诺环素;牙周炎;致病菌;生物膜

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Inhibition effect of melatonin combined with minocycline hydrochloride against mixed biofilms of periodontal pathogens

YANG Yu-qing¹, YE Jing², LIU Qing¹, QUE Ke-hua¹, ZHANG Xi¹, LIU Ying¹

(1.Department of Endodontics, Hospital of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Stomatology, Tianjin Hospital, Tianjin City, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To explore the inhibitory effect of melatonin combined with minocycline hydrochloride on mixed biofilm of periodontal pathogens, and to explore new methods for drug treatment of periodontal antimicrobial spots. **Methods:** The minimal inhibitory concentration(MIC), minimum bactericidal concentration(MBC) of melatonin and minocycline hydrochloride against the main periodontal pathogens. *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* were measured by microliquid dilution method, and the bacteriostatic concentration index(FICI) of the combination of drugs on the main periodontal pathogens was detected by microcheckerboard dilution method. The effect of drug combination on biofilm of single and mixed strains was evaluated by crystal violet staining. The inhibition and discrete effects of combined drugs on mixed bacterial biofilms was assessed by confocal laser scanning microscopy. **Results:** The MIC values of melatonin to *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* were all 1%, MBC values were 2%, MIC values of the above mixed bacteria were 2%, MBC values were 4%. Melatonin combined with minocycline hydrochloride showed a synergistic effect on the growth inhibition of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetes*, and an additive effect on *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* and mixed bacteria suspension. Compared with the control group, the combination of melatonin and minocycline hydrochloride could significantly improve the inhibition and discrete effect of various periodontal pathogens and mixed bacteria. When the experimental group was 1% + 1/2 MIC, the inhibition of single species and mixed multispecies biofilms increased most significantly ($P<0.05$). When the drug concentration was 1% + MIC, the discrete effect of the biofilm increased significantly ($P<0.05$), and the inhibition and clearance effect were higher than that of minocycline hydrochloride with a pure concentration of 2MIC. **Conclusion:** Melatonin combined with minocycline hydrochloride can significantly improve the inhibition ability of periodontal plaque biofilm, which is expected to play a role in the adjuvant treatment of periodontitis.

Key words melatonin; minocycline hydrochloride; periodontitis; pathogenic bacteria; biofilm

基金项目 天津市卫健委科研项目(ZC20118);天津市卫健委科技项目(TJWJ2023MS008)

作者简介 杨雨晴(1997-),女,硕士在读,研究方向:牙体牙髓病和牙周病的治疗;通信作者:刘颖, E-mail:yingliu04@tmu.edu.cn.

牙周炎是由于牙菌斑中的细菌侵犯牙周组织而引起的慢性炎症性疾病。临床中治疗牙周炎的关键是控制菌斑,常规治疗方法包括机械治疗和手术治疗。但是,由于口腔解剖结构的复杂性,牙周袋底、根分叉等区域器械难以到达,而菌斑微生物无法被彻底清除可导致牙周治疗失败^[1]。因而,临床中会辅以药物治疗以提高菌斑生物膜的控制效果^[2]。目前,临床上常用于牙周炎辅助治疗的药物有甲硝唑、阿莫西林、四环素等抗生素类药物,其中盐酸米诺环素(minocycline hydrochloride, MINO)是治疗牙周炎最常用的抗生素之一,对多种牙周病原体具有显著抑制作用,同时能抑制胶原酶和基质金属蛋白酶的活性,减少对牙周结缔组织和骨组织的破坏,有利于缓解牙周炎症^[3]。但药物导致的细菌耐药问题仍无法避免,且单一用药仍不能获得理想的治疗效果^[4],需要探索更安全、高效的药物辅助治疗方案。

褪黑素(melatonin, MEL)是一种由色氨酸分子衍生的内源性物质,不仅具有抗炎、抗氧化等生理功能,而且研究发现其与环丙沙星、多黏菌素等药物联合应用时,具有提高药物疗效、降低最小抑菌浓度和降低药物毒性的能力^[5]。近年来,褪黑素在口腔领域的研究也取得一定的进展,研究表明,褪黑素对浮游状态下的牙龈卟啉单胞菌和伴放线聚集杆菌具有明显抑制作用;还具有控制牙周组织的炎症,抑制局部牙槽骨吸收,促进牙周愈合的潜能^[6-7]。然而,褪黑素与菌斑抑制药物联合应用对牙周炎的辅助治疗作用尚未见国内外文献报道。因此,本研究旨在探究褪黑素与盐酸米诺环素联合应用对牙周致病菌及其混合生物膜的抑制作用,为临床治疗牙周炎提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*, S.g, ATCC10558)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P.g, ATCC33277)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, F.n, ATCC25586)、伴放线聚集杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, A.a, ATCC 43717)为天津医科大学口腔医学院实验室储存。

1.1.2 主要试剂和仪器 褪黑素(上海生工生物工程股份有限公司)、盐酸米诺环素(上海源叶生物科技有限公司)、脑心浸出液培养基(BHI 奥博星生物技术有限责任公司)、电热恒温培养箱(上海跃进HDPN-II-256型)、高速离心机(美国 Sigma)、酶标仪(美国 ThermoFisherScientific)、紫外分光光度计

(美国 BECKMAN), Axio-Imager_LSM-800 型激光共聚焦显微镜(CLSM 德国卡尔蔡司公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 用无菌去离子水将盐酸米诺环素配置成浓度为 1 mg/mL 的母液。将 80 mg 褪黑素溶解于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中配置成 8% 的母液,溶剂 DMSO 的终浓度为 0.1%。上述溶液均经 0.22 μm 滤网过滤消毒后储存于 4℃ 备用。

1.2.2 实验菌种的复苏与培养 将 S.g、F.n、P.g、A.a 复苏后接种于 BHI 固体培养基进行培养, F.n、P.g、A.a 置于厌氧(80% N₂, 20% CO₂)环境、S.g 置于微需氧(5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂)环境下 37℃ 培养,观察菌落形态并确认为纯培养后,挑单菌落于 BHI 液体培养基中继续静置培养至对数生长期, 3 000 r/min, 5 min 离心后重悬菌液,配制成 1×10⁷ CFU/mL 菌悬液保存备用。

1.2.3 牙本质片的制备 本研究经天津医科大学口腔医院医学伦理委员会批准(批准号:TMUhmEC20221107)。纳入标准:离体牙发育完全,牙体完整,无裂纹,无龋坏,无充填物。将存于 0.1%麝香草酚中的离体磨牙制备成 3 mm×3 mm×1 mm(长×宽×高)的牙本质片,使用砂纸打磨抛光,共制备 50 片。随后将其置于 17% EDTA 溶液中 1 min,超声荡洗 10 min。高温高压灭菌 30 min 后,随机抽取 2 片置于 BHI 液体培养基中,37℃微需氧条件下静置培养 24 h,以检测牙本质片表面灭菌效果。在确定无残余活细菌后,将牙本质片浸泡于无菌生理盐水中,4℃冰箱保存备用。

1.2.4 细菌间相互作用及混合菌悬液的制备 使用平板对峙法确定 4 种细菌间是否具有相互作用,如无互相抑制作用则可将上述各菌液按照 1:1:1:1 的比例混合,建立多菌种混合菌悬液模型,同样调整接种混合菌悬液浓度约为 1×10⁷ CFU/mL。

1.2.5 测定盐酸米诺环素和褪黑素的 MIC 和 MBC 测定褪黑素的 MIC 采用液体二倍稀释法,阴性对照组为含 5% DMSO 的菌悬液和不含药物的菌悬液,每个浓度设 3 个复孔,培养条件同 1.2.2。按照同样方法将盐酸米诺环素溶液稀释,阴性对照组为不含药物的菌悬液,每个浓度设 3 个平行孔。若肉眼观察孔内无细菌生长则对应的浓度即为 MIC 值。采用菌落计数法测定各菌 MBC 值:从所有大于或等于 MIC 的实验组内取 20 μL 菌液分别涂布于 BHI 固体血平板上,S.g 于 37℃ 下微需氧环境培养 24 h,其余细菌均于厌氧 37℃ 培养 48 h 后分别进行菌落计数,肉眼观察培养基中无菌落生长的最低药物浓度即为 MBC 值。实验于不同时间重复 3 次。

1.2.6 褪黑素联合盐酸米诺环素抑菌浓度分数指数(FICI)的测定 采用微量棋盘稀释法,在无菌96孔板中盐酸米诺环素从横排加入,褪黑素从纵排加入。盐酸米诺环素和褪黑素的终浓度均为2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC、1/32MIC、1/64MIC,盐酸米诺环素和褪黑素照浓度由高到低分别加入药液和菌悬液各100 μL,阴性对照组每孔均加入BHI液体培养基和菌悬液各100 μL,培养条件同1.2.2。实验于不同时间重复3次。根据96孔板中联合药敏抑菌情况与单独药敏抑菌情况计算FICI,计算公式如下: $FICI = \frac{\text{甲药联合时 MIC} / \text{甲药单独时 MIC} + \text{乙药联合时 MIC} / \text{乙药单独时 MIC}}$ 。当 $FICI \leq 0.5$ 时联合药敏表现为协同作用, $0.5 < FICI \leq 1$ 时为相加作用, $1 < FICI \leq 2$ 时为无关作用, $FICI > 2$ 时为拮抗作用。

1.2.7 两药联合对牙周主要致病菌单菌种和混合生物膜形成的作用 在96孔板中,每孔先加入100 μL *S.g.*、*F.n.*、*P.g.*、*A.a.*和混合菌悬液,后实验组分别加入100 μL药液(终浓度为1%的褪黑素联合2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC的盐酸米诺环素溶液),阳性对照组为单独盐酸米诺环素(终浓度为2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC),阴性对照组分为两组,不含药物的BHI液体培养基和含5% DMSO的溶液,每组3个复孔,于相应培养环境下静置培养48 h。48 h后移除培养基及悬浮细菌,PBS冲洗,然后往孔板内加入戊二醛固定15 min,吸出干燥后每孔加200 μL结晶紫溶液,染色20 min,去离子水冲洗,37℃恒温箱中烘干15 min,每孔加200 μL 95%乙醇溶液,静置5 min,酶标仪检测菌悬液在600 nm处的OD值。生物膜抑制率=(阴性对照组OD₆₀₀-实验组OD₆₀₀)/阴性对照组OD₆₀₀×100%^[8]。

1.2.8 两药联合对牙周主要致病菌单菌种和混合生物膜的离散作用 96孔板内建立48 h单菌种和多菌种生物膜,48 h后移除培养基及悬浮细菌,PBS冲洗。实验组分别加入100 μL的药液(终浓度为1%的褪黑素联合2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC的盐酸米诺环素溶液),阳性对照组为单独盐酸米诺环素(终浓度为2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC),阴性对照组分为两组,不含药物的BHI液体培养基和含5% DMSO的溶液,每组3个复孔,继续培养48 h,结晶紫染色法检测各组生物膜在600 nm处的OD值。生物膜清除率=(阴性对照组OD₆₀₀-实验组OD₆₀₀)/阴性对照组OD₆₀₀×100%。

1.2.9 CLSM 评估两药联合应用对混合生物膜的抑制及离散作用 对于生物膜形成的测定,将牙本质片分为3组($n=8$)置于48孔板中,每孔加入200 μL

混合菌悬浮液,实验组分别加入200 μL终浓度为1%+1/4MIC和1%+1/2MIC的两药混合溶液,阳性对照组加入200 μL终浓度为1/4MIC和1/2MIC的盐酸米诺环素溶液,阴性对照组加等量含氯化血红素-Vk溶液的BHI培养基,每组3个复孔,在37℃、厌氧环境下静置培养48 h后检测药物对多菌种生物膜形成的影响。

对于生物膜离散的测定,将牙本质片分为3组($n=8$)置于48孔板中,每孔加入200 μL混合菌悬浮液,37℃、厌氧环境下静置培养48 h,以建立48 h多菌种生物膜模型。实验组分别加入200 μL终浓度为1%+1/2MIC和1%+MIC的两药混合溶液,阳性对照组加入200 μL终浓度为1/2MIC和MIC的盐酸米诺环素溶液,阴性对照组加等量含氯化血红素-Vk溶液的BHI培养基,每组3个复孔,于相应环境下静置培养24 h后分别检测药物对多菌种生物膜离散的影响。

上述样本处理后,将每组的生物膜上清液吸除,处理后各组避光条件下加入SYTO-9/PI混合液1 mL,用PBS漂洗2次,去除残液,使用CLSM观察牙本质片表面多菌种生物膜的情况,每个样本均随机选取3个视野进行观察。观察条件为SYTO-9的激光发射波长为488/525 nm,PI的激光发射波长为561/642 nm,并用Imaris v.7.2.3图像分析软件确定红色荧光面积代表的死菌总量。

1.3 统计学处理 采用SPSS 26.0统计软件对本次研究的数据结果进行分析,正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素ANOVA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 褪黑素和盐酸米诺环素对各致病菌的MIC和MBC 褪黑素对*S.g.*、*F.n.*、*P.g.*、*A.a.*的MIC值均为1%,MBC值均为2%,对混合菌液的MIC值为2%,MBC值为4%。盐酸米诺环素对*S.g.*、*F.n.*、*P.g.*、*A.a.*和混合菌液的MIC值分别为4、4、8、8、16 μg/mL,MBC值分别为32、32、64、64、128 μg/mL。

2.2 两药联用对各牙周致病菌及混合菌悬液的MIC 采用微量棋盘稀释法测得褪黑素和盐酸米诺环素联合用药实验的结果。在联合应用时对*S.g.*的MIC_{褪黑素}=0.5%,MIC_{盐酸米诺环素}=0.062 5 μg/mL,FICI=0.515 6>0.5,表明两者联合对*S.g.*的抑菌效果为相加作用。在联合应用时对*F.n.*的MIC_{褪黑素}=0.5%,MIC_{盐酸米诺环素}=0.062 5 μg/mL,FICI=0.515 6>0.5,表明两者联合对*F.n.*的抑菌效果为相加作用。二者联用时对*P.g.*的MIC_{褪黑素}=0.25%,

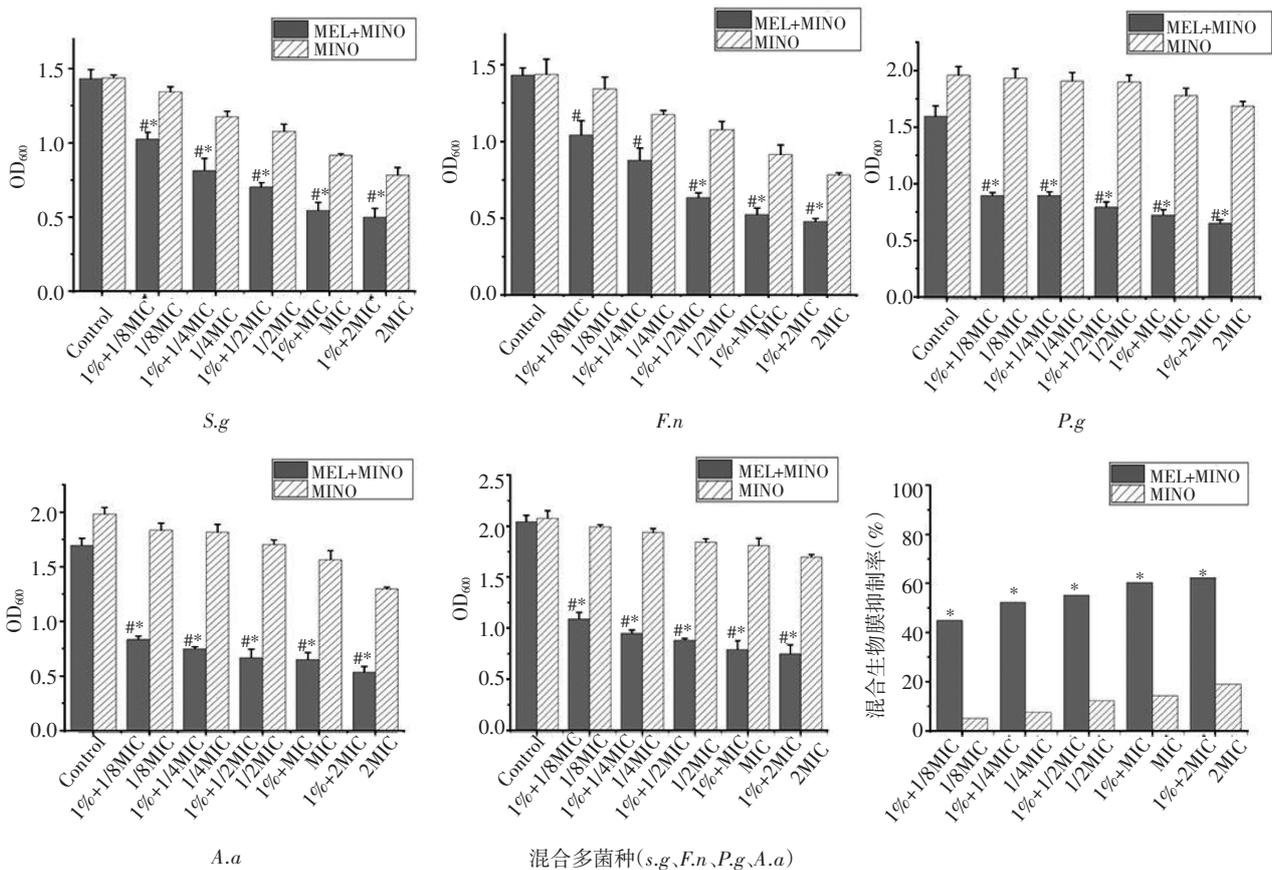
MIC_{盐酸米诺环素}=0.125 μg/mL, FICI=0.265 6 ≤ 0.5, 表明两者对 *P.g* 的抑菌效果为协同作用。二者联用时对 *A.a* 的 MIC_{褪黑素}=0.25%, MIC_{盐酸米诺环素}=0.125 μg/mL, FICI=0.265 6 ≤ 0.5, 表明两者对 *A.a* 的抑菌效果为协同作用。二者联用时对混合菌悬液的 MIC_{褪黑素}=1%, MIC_{盐酸米诺环素}=0.25 μg/mL, FICI=0.515 6 > 0.5, 则两者对混合菌悬液的抑菌效果为相加作用。

2.3 两药联合对牙周主要致病菌单菌种及混合生物膜形成的抑制作用 结晶紫染色法结果显示, 两药联合处理组生物膜形成量随药物浓度的增加而逐渐降低, 说明药物对生物膜形成的抑制作用呈现浓度依赖。除 *F.n* 中 1%+1/8MIC 和 1%+1/4MIC 组, 两药联合对单菌种和混合生物膜的生物膜生物量与单独盐酸米诺环素组相比显著降低 ($P < 0.05$)。结果还显示, 当褪黑素和盐酸米诺环素联合作用时, 对 *P.g*、*A.a* 的抑制效果优于 *F.n* 和 *S.g*。

此外, 当药物浓度为 1%+1/2MIC 时, 混合多菌种生物膜形成能力下降更为明显, 抑制率可达 55.3%, 高于 2MIC 盐酸米诺环素单独应用时的抑制率 (19.0%), 见图 1。

2.4 两药联合对牙周主要致病菌单菌种及混合菌种生物膜的离散作用 结果表明, 随着药物浓度的升高, 两药联合使用对牙周主要致病菌单菌种和混合生物膜的离散作用也逐渐增强。除 1%+1/8MIC 组, 其他各浓度组的生物膜量均明显低于非药物处理的对照组 ($P < 0.05$)。与单独盐酸米诺环素组相比, 药物联合浓度 ≥ 1%+1/4MIC 时, *S.g*、*F.n* 和 *A.a* 的 OD 值均显著降低 ($P < 0.05$)。此外, 两药联合应用对 *S.g*、*F.n* 和 *A.a* 生物膜的离散作用相当, 而对 *P.g* 的离散效果相对较差。结果还显示, 当药物联合浓度为 1%+MIC 时, 相较于单独盐酸米诺环素, 其对混合生物膜的清除率提高最显著, 提高了 20.2%, 且清除效果高于单独使用时的 2MIC 盐酸米诺环素, 见图 2。

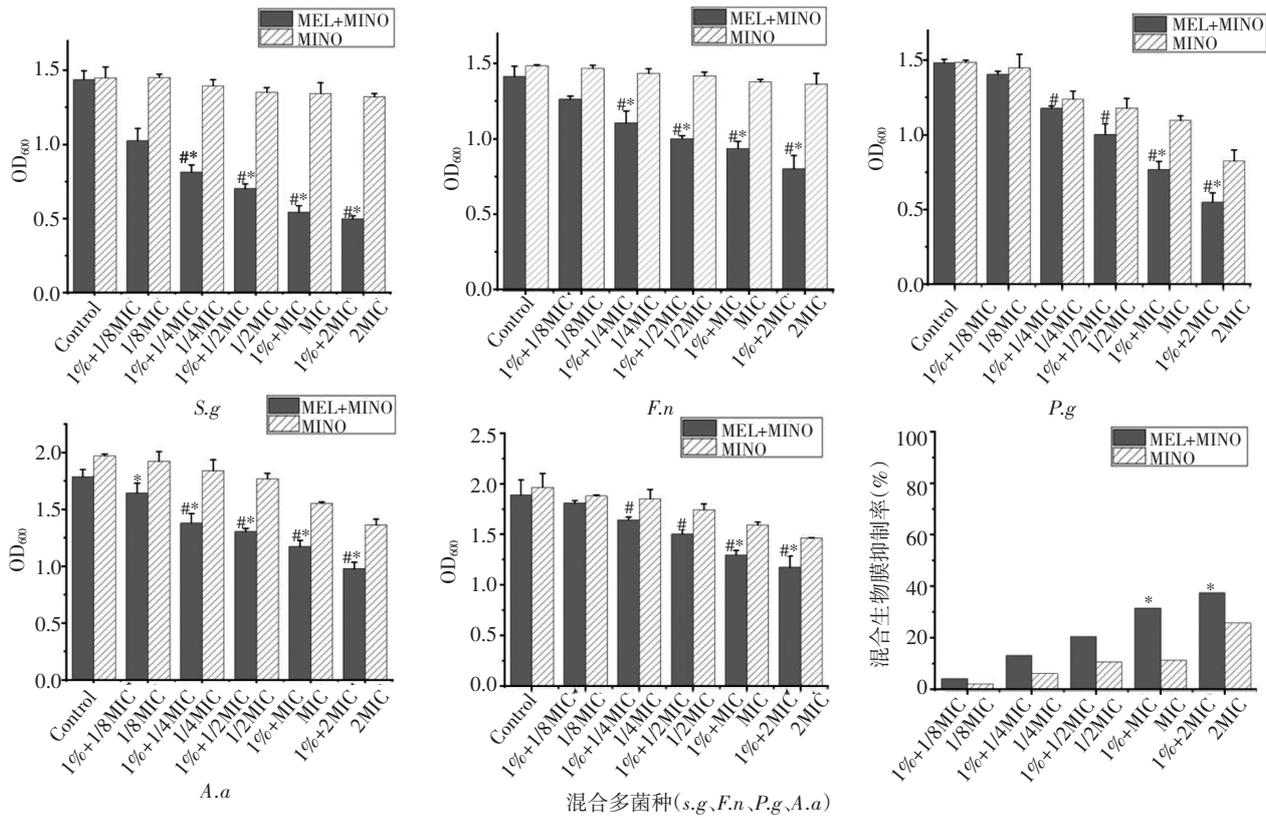
2.5 CLSM 观察两药联合对混合生物膜的抑制和离散作用 进一步应用荧光染色法评估褪黑素联合盐酸米诺环素对牙本质表面混合生物膜的抑制和离散作用 (图 3)。绿色荧光显示活菌, 红色荧光为死菌。CLSM 可观察到, 两药联合处理后的死菌数量较单独盐酸米诺环素组和 Control 组显著增多。



注: 与单独盐酸米诺环素组相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, # $P < 0.05$

图 1 褪黑素联合盐酸米诺环素对各致病菌和混合生物膜形成的影响

Fig 1 Effect of melatonin combined with minocycline hydrochlorid on biofilm formation in various pathogenic bacteria and mixed biofilms



注:与单独盐酸米诺环素组相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, # $P < 0.05$

图 2 褪黑素联合盐酸米诺环素对各致病菌生物膜的离散作用

Fig 2 Effect of melatonin combined with minocycline hydrochloride on the discrete of biofilms by various pathogenic bacteria and mixed biofilms

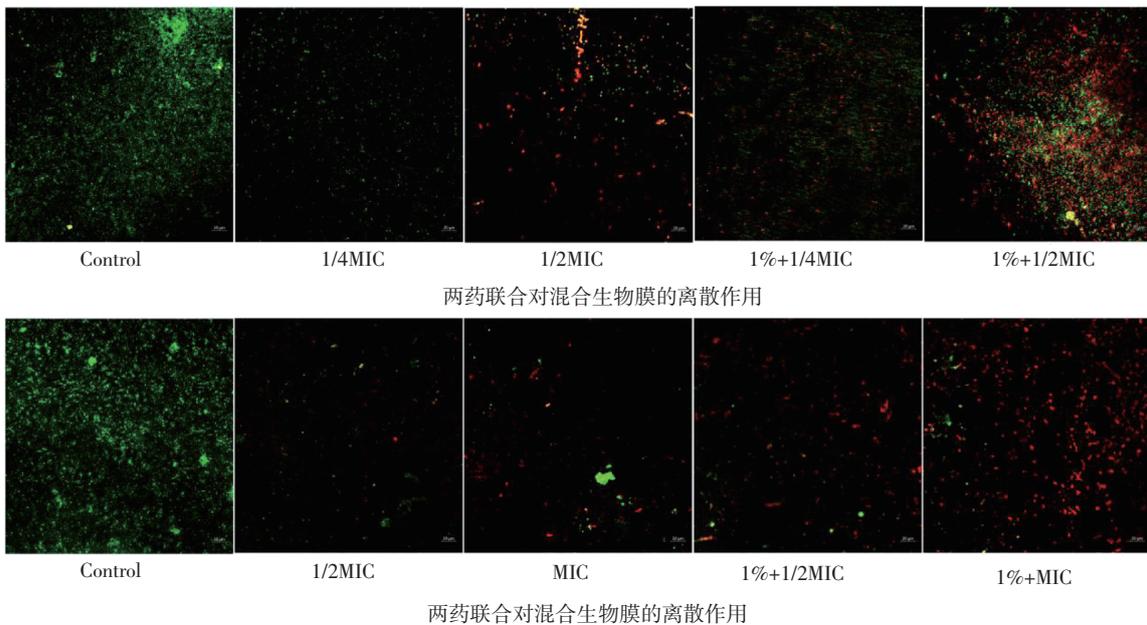


图 3 药物联合处理后对牙本质表面混合生物膜的 CLSM 图像(SYTO-9/PI staining, 200 \times)

Fig 3 CLSM images of mixed biofilm on the dentine surface after drug combination treatment (SYTO-9/PI staining, 200 \times)

3 讨论

菌斑生物膜是由多种微生物组成的生态系统,也是牙周炎的始动因子^[9]。因此,生物膜的清理和控制是牙周炎治疗的主要目的。研究表明,药物治疗在牙周炎的治疗中具有抑制细菌、控制炎症、促进

牙周组织再生的作用^[10],故药物治疗可以作为牙周基础治疗的辅助疗法以提高牙周炎治疗的成功率。但药物治疗可能存在诱导细菌耐药性等的潜在风险,因此,寻找一种更安全有效的牙周辅助治疗方式具有重要的临床意义。

本研究拟评估褪黑素与盐酸米诺环素联合应用对 *S.g*、*F.n*、*P.g*、*A.a* 4 种细菌单菌种和混合多菌种浮游细菌和生物膜的抗菌性能。*S.g* 是菌斑生物膜的早期定植者之一^[11]。*F.n* 通过表达多种黏附素发挥桥梁作用,连接早期和晚期定植菌以促进菌斑生物膜的形成和成熟^[12]。*P.g* 是牙周炎病变区的优势菌,可参与生物膜的形成,释放多种毒力因子破坏宿主免疫细胞,引起牙周组织的破坏^[13]。*A.a* 可分泌多种细胞毒素,从而加快牙周附着丧失和牙槽骨吸收^[14]。这几种细菌均在牙周炎的发生、发展过程中起着重要作用。

盐酸米诺环素是临床牙周炎治疗的常用药物,但其长期应用可能导致抗生素耐药等问题,且单独使用达不到理想的治疗效果^[15]。褪黑素是一种内源性吲哚类激素,具有很高的水溶性和脂溶性,近期研究发现在牙周炎患者中唾液褪黑素水平降低,提示褪黑素可作为牙周病诊断的重要生物标志物^[16],也有研究显示褪黑素对多重耐药、革兰阳性和革兰阴性细菌具有有效的抗菌活性^[17]。Zhou 等^[17]首次报道褪黑素对体外 *P.g* 的作用,发现其对 *P.g* 具有体外抗菌活性。本实验研究结果同样显示褪黑素对 *S.g*、*F.n*、*P.g*、*A.a* 4 种细菌及混合菌悬液均有抑制作用。已有研究证实褪黑素与抗生素联合应用可提高抗生素的治疗效果,减少药物不良反应,故本实验探讨褪黑素与盐酸米诺环素联合应用对牙周致病菌的抗菌效果。联合药敏结果表明,两药联合使用将盐酸米诺环素的 MIC 降低至单用时的 1/64,同时,两药联用对 *P.g* 和 *A.a* 具有协同抑菌效果 ($FICI \leq 0.5$),对 *S.g*、*F.n* 和混合菌悬液表现为相加作用 ($0.5 < FICI \leq 1$),证明褪黑素与盐酸米诺环素联用可增强对牙周致病菌的抑制效果,有助于降低细菌耐药的发生。

口腔环境中的牙周致病菌主要是以混合生物膜形式存在,生物膜的耐药性较浮游细菌高 100~1 000 倍^[18]。为了更准确地评估褪黑素与盐酸米诺环素联合应用的抑菌性能,本研究结晶紫染色法以及 CLSM 检测进一步评估了联合用药对 4 种牙周致病菌混合生物膜形成和离散的影响。结果显示,联合用药对单菌种和混合生物膜均具有良好的抑制和离散作用,并呈现剂量依赖性。在抑制生物膜形成的实验中,当联合药物浓度为 1%+1/2MIC 时,对混合多菌种生物膜抑制能力提升最为明显,生物膜抑制率从 12.4%提高至 55.3%,且相比于单独应用 2MIC 的盐酸米诺环素抑菌能力增强 36.3%。在生物膜离散实验中,两药联合浓度为 1%+MIC 时,对混合生物膜的清除作用提升最为显著,清除率较

单独应用盐酸米诺环素高 20.2%,且清除效果显著高于单用 2MIC 的盐酸米诺环素。本研究结果显示,混合生物膜与单菌种生物膜对药物的敏感性存在差异。因此,应用更加模拟临床的混合生物膜模型来评估药物的抗菌作用更为准确。CLSM 结果同样显示,两药联合处理后牙本质表面的死菌数量明显多于 Control 组和单独盐酸米诺环素组。因此,本实验结果表明:褪黑素与盐酸米诺环素联合应用可显著提高单一用药对牙周致病菌生物膜的抗菌作用。此外,褪黑素还具有下调牙龈组织中促炎细胞因子的表达、抑制牙槽骨吸收、促进成骨细胞增殖的作用^[19]。因而,褪黑素可能于控制牙周炎症和促进组织再生中发挥积极作用。

目前,药物联合应用的抗菌机制尚未明朗,分析其可能由于褪黑素可与细菌内的铁、铜和锌等金属离子螯合,降低细菌细胞内底物和细菌细胞膜表面的脂质水平导致细菌细胞膜通透性改变,使两种药物更容易进入细菌内发挥抗菌作用相关^[6]。

综上所述,褪黑素联合盐酸米诺环素可显著提高对牙周致病菌斑生物膜的抑制和清除能力,并可降低盐酸米诺环素的药物浓度,预防细菌耐药性的发生,有望在牙周炎的辅助治疗中发挥作用。

参考文献:

- [1] LI Y, JIAO J, QI Y, et al. Curcumin: a review of experimental studies and mechanisms related to periodontitis treatment[J]. J Periodontol Res, 2021, 56(5): 837-847.
- [2] AOKI A, MIZUTANI K, MIKAMI R, et al. Residual periodontal pocket treatment with Er:Yag laser-assisted comprehensive periodontal pocket therapy: a retrospective study[J]. Clin Oral Invest, 2022, 26(1): 761-771.
- [3] TELES F, LYNCH M C, PATEL M, et al. Bacterial resistance to minocycline after adjunctive minocycline microspheres during periodontal maintenance: a randomized clinical trial[J]. J Periodontol, 2021, 92(9): 1222-1231.
- [4] ZHANG T, QIU Y, SONG J, et al. Electrospayed minocycline hydrochloride-loaded microsphere/saib hybrid depot for periodontitis treatment[J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 620-633.
- [5] LIU Y, JIA Y, YANG K, et al. Melatonin overcomes mcr-mediated colistin resistance in gram-negative pathogens[J]. Theranostics, 2020, 10(23): 10697-10711.
- [6] ZHOU W, ZHANG X, ZHU C L, et al. Melatonin receptor agonists as the "Perioceutics" agents for periodontal disease through modulation of porphyromonas gingivalis virulence and inflammatory response[J]. PloS One, 2016, 11(11): e166442.
- [7] LIU R Y, LI L, ZHANG Z T, et al. Clinical efficacy of melatonin as adjunctive therapy to non-surgical treatment of periodontitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Inflammopharmacology, 2022, 30(3): 695-704.
- [8] 李杰, 刘艳, 岑运珠, 等. 右旋氨基酸对粪肠球菌生物膜形成和离

- 散的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2018,28(12):683-688.
- [9] JAKUBOVICS N S, GOODMAN S D, MASHBURN-WARREN L, et al. The dental plaque biofilm matrix[J]. *Periodontol*, 2000, 2021, 86(1): 32-56.
- [10] WANG Y, DENG J, ZHANG T, et al. A study on the use of phase transition lysozyme-loaded minocycline hydrochloride in the local treatment of chronic periodontitis[J]. *Acs Appl Bio Mater*, 2022, 5(7):3146-3157.
- [11] CHOO S W, MOHAMMED W K, MUTHA N, et al. Transcriptomic responses to coaggregation between streptococcus gordonii and streptococcus oralis[J]. *Appl Environ Microb*, 2021, 87(22):e155821.
- [12] BRENNAN C A, GARRETT W S. Fusobacterium nucleatum—symbiont, opportunist and oncobacterium[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3):156-166.
- [13] BREGAIN T S, BOYER E, FONG S B, et al. Porphyromonas gingivalis outside the oral cavity[J]. *Odontology*, 2022, 110(1):1-19.
- [14] BROWN A C, BOESZE-BATTAGLIA K, BALASHOVA N V, et al. Membrane localization of the repeats-in-toxin(Rtx) leukotoxin(Ltxa) produced by aggregatibacter actinomycetemcomitans[J]. *PloS One*, 2018, 13(10):e205871.
- [15] CHEN Q, YAN W, GENG N. The efficacy of minocycline hydrochloride combined with multiple antibiotic paste in elderly patients with chronic periodontitis and concomitant pulp lesions[J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2022, 2022:7604741.
- [16] 杨世缘,胡月,周宇宁,等.褪黑素在牙周炎诊治中的研究进展[J].*口腔医学*,2021,41(3):259-264.
- [17] TEKBAS O F, OGUR R, KORKMAZ A, et al. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule[J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(2):222-226.
- [18] KARATAN E, WATNICK P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms[J]. *Microbiol Mol Biol*, 2009, 73(2):310-347.
- [19] HE F, WU X Y, ZHANG Q Z, et al. Bacteriostatic potential of melatonin: therapeutic standing and mechanistic insights[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:683879.

(2023-02-20 收稿)

(上接第 485 页)

- and 8-iso-prostaglandin F2 α as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2016, 48(1):7.
- [24] PROVOST C, CHOUFANI F, AVEDANIAN L, et al. Nitric oxide and reactive oxygen species in the nucleus revisited[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3):296-304.
- [25] GHANTA S, TSOYI K, LIU X, et al. Mesenchymal stromal cells deficient in autophagy proteins are susceptible to oxidative injury and mitochondrial dysfunction[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(3):300-309.
- [26] NAKAHIRA K, HISATA S, CHOI A M. The roles of mitochondrial damage associated molecular patterns in diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23:1329-1350.
- [27] DANDO I, FIORINI C, POZZA E D, et al. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(3):672-679.
- [28] 肖雅文,王毅,潘鹏飞,等.脓毒症线粒体损伤的研究进展[J].*新疆医学*,2019,49(3):225-229.
- [29] LV M, WANG C, LI F, et al. Structural insights into the recognition of phosphorylated FUNDC1 by LC3B in mitophagy[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(1):25-38.
- [30] 曹洪兵.左西孟旦治疗心力衰竭的疗效评价[J].*中国现代药物应用*,2022,16(13):107-109.

(2023-02-28 收稿)