

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.06.0527

论著

α -淀粉酶联合 D-精氨酸对牙周炎相关致病菌混合生物膜的分散和抑制作用

于淑娴¹, 刘颖¹, 叶静², 温特², 马贲²

(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 α -淀粉酶和 D-精氨酸联合应用对牙周致病菌及混合生物膜的分散和抑制作用。方法:通过结晶紫染色分别测定 α -淀粉酶和 D-精氨酸对牙周主要致病菌(戈登链球菌、具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌)的最小生物膜清除浓度(MBEC)和最小生物膜抑制浓度(MBIC)。通过微量棋盘稀释法确定与 0.2% 氯己定作用等效的联合用药浓度,并结合激光共聚焦显微镜(CLSM)评估其对多菌种生物膜的分散与抑制效果。结果: α -淀粉酶对单菌种和多菌种生物膜的 MBEC、MBIC 均为 10 g/L。D-精氨酸对单菌种 MBEC 和 MBIC 均为 128 mmol/L, 对多菌种生物膜 MBEC 为 128 mmol/L, MBIC 为 256 mmol/L。联合应用 1.0 g/L α -淀粉酶和 32 mmol/L D-精氨酸的分散作用以及 0.5 g/L α -淀粉酶和 32 mmol/L D-精氨酸的抑制作用, 均与 0.2% 氯己定效果相当。在 CLSM 检测的分散和抑制研究中,与单独用药相比,联合应用 α -淀粉酶和 D-精氨酸处理后的样本中活菌量最少($F=781.3, 362.5, P<0.001$), 且与 0.2% 氯己定组相比无统计学差异($P>0.05$)。结论: α -淀粉酶联合 D-精氨酸可显著提高对牙周致病菌混合生物膜的分散和抑制能力。

关键词 α -淀粉酶; D-精氨酸; 牙周炎; 致病菌; 生物膜

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)06-0527-09

Dispersion and inhibition effect of α -amylase combined with D-arginine against multispecies biofilms of periodontitis-associated pathogenic bacteria

YU Shuxian¹, LIU Ying¹, YE Jing², WEN Te², MA Ben²

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

Abstract Objective: To evaluate the dispersion and inhibition effect of α -amylase in combination with D-arginine on periodontal pathogens and multispecies biofilms. **Methods:** Minimum biofilm clearance concentration (MBEC) and minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of α -amylase and D-arginine against the major periodontal pathogens (*Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Porphyromonas gingivalis*) were determined by crystalline violet staining. The micro checkerboard dilution method was applied to determine the concentration of drug combination that was equivalent to the effect of 0.2% chlorhexidine (CHX). Combined with confocal laser scanning microscope (CLSM), its dispersion and inhibition effect on multispecies biofilms was assessed. **Results:** The MBEC and MBIC of α -amylase were 10 g/L for both single-species biofilm and multispecies biofilm. D-Arginine had MBEC and MBIC values of 128 mmol/L for single-species biofilm. D-Arginine had MBEC values of 128 mmol/L, and MBIC values of 256 mmol/L for multispecies biofilm. The dispersion effect of the combined application of 1.0 g/L α -amylase with 32 mmol/L D-arginine and the inhibition effect of 0.5 g/L α -amylase with 32 mmol/L D-arginine were comparable to the effect of 0.2% CHX. In the dispersion and inhibition study of CLSM assay, the combined application of α -amylase and D-arginine resulted in the lowest viable bacterial count compared to either agent alone ($F=781.3, 362.5, P<0.001$), with no statistically significant difference from the 0.2% CHX group ($P>0.05$). **Conclusion:** The combination of α -amylase and D-arginine significantly enhances the dispersion and inhibition efficacy against multispecies biofilms of periodontal pathogens.

Key words α -amylase; D-arginine; periodontitis; pathogenic bacteria; biofilm

牙周炎是一种由菌斑生物膜感染引起、以牙周支持组织进行性破坏为特征的慢性感染性疾病,在全球范围内的人群患病率高达 45%~50%^[1-2]。口腔卫生维护差会加剧生物膜沉积,进而引发牙周组织

破坏甚至牙齿脱落^[3-4]。目前,牙周炎的治疗方法主要包括龈上洁治、龈下刮治、局部和全身用药以及手术治疗等^[4]。常用抗菌剂如氯己定通过破坏细菌生物膜结构发挥杀菌作用,并在牙面形成阳离子

基金项目 天津市教委科研计划项目(自然科学,2021KJ245);天津市天津医院科技基金(TJYY2404)

作者简介 于淑娴(1999-),女,硕士在读,研究方向:牙体牙髓和牙周病的治疗;通信作者:马贲, E-mail: 18604520557@163.com。

层,抑制菌斑黏附与生物膜形成^[5]。然而,牙周炎中复杂的生物膜环境易诱导细菌产生耐药变异,增强其毒力的表达并抵抗宿主免疫防御^[6-7]。氯己定对不同菌种作用差异大,易导致菌群失衡,且难以穿透成熟生物膜,清除深层细菌效果有限^[7]。针对这些难题,有研究提出以生物膜为靶点的治疗新策略,在有效清除细菌生物膜的同时,避免破坏菌群生态平衡。

α -淀粉酶属于糖苷水解酶家族,能够特异性水解生物膜胞外聚合物基质(EPS)中的多糖成分,从而破坏生物膜的结构完整性^[8-9]。EPS由多糖、蛋白质、胞外DNA以及脂类等多种成分构成三维网状结构^[10]。由于 α -淀粉酶仅作用于EPS中的单一成分,难以全面破坏其复杂结构,因此单独使用时清除生物膜的效果有限,需联合靶向其他成分的药物以增强协同效应。D-精氨酸是一种小分子生物膜分散剂,可通过干扰细菌肽聚糖的组成、数量和结构强度,并抑制EPS中脂蛋白的产生,从而干扰生物膜的形成^[11-12]。因此,本研究联合应用 α -淀粉酶和D-精氨酸,分别靶向生物膜EPS中的不同成分,旨在探讨二者联合在牙周炎相关致病菌及其混合菌生物膜分散与抑制中的作用,探索一种更安全高效的抗生物膜治疗策略,以应对牙周炎等生物膜相关的口腔感染。

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.gordonii*, ATCC10558)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F.nucleatum*, ATCC25586)和牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*, ATCC33277)。

1.1.2 主要试剂和仪器 α -淀粉酶、D-精氨酸(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公司),酶标仪(美国ThermoFisherScientific公司),紫外分光光度计(美国BECKMAN公司),Axio-Imager_LSM-800型激光共聚焦显微镜(CLSM,德国卡尔蔡司公司),活/死细菌染色试剂盒(上海贝博生物科技有限公司)和结晶紫粉末(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 用BHI培养基将 α -淀粉酶配制成40 g/L的母液,将D-精氨酸配制成512 mmol/L的母液,经0.22 μ m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.gordonii*、*F.nucleatum*和*P.gingivalis*复苏后接种于BHI固体培养基进行培养,*S.gordonii*置于微需氧(5% O₂、85% N₂、10% CO₂)环境,*F.nucleatum*和*P.gingivalis*置于厌氧(80% N₂、20% 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,均配制成1×10⁷ CFU/mL菌悬液保存备用。

1.2.3 测定 α -淀粉酶和D-精氨酸的最小生物膜清除浓度 96孔板内建立48 h单菌种(*S.gordonii*、*F.nucleatum*和*P.gingivalis*)和多菌种生物膜(上述菌种1:1:1混合),48 h后PBS冲洗。实验组分别加入200 μ L不同浓度 α -淀粉酶溶液(终浓度:20、10、5、2.5、1、0.5、0.1 g/L),阳性对照组为0.2%氯己定,阴性对照组为BHI培养基,每组设3个复孔。重复上述实验,将 α -淀粉酶换为D-精氨酸溶液(终浓度:512、256、128、64、32、16、8、4 mmol/L)。继续培养30 min后,戊二醛固定30 min,吸液干燥,每孔加200 μ L结晶紫溶液染色20 min,经PBS冲洗后再加入200 μ L 95%乙醇溶液,静置5 min。最后于600 nm处测定OD值。经统计分析,OD值最小所对应药液的最低浓度即为最小生物膜清除浓度(MBEC)。

1.2.4 测定 α -淀粉酶和D-精氨酸的最小生物膜抑制浓度 在96孔板中,每孔先加入100 μ L *S.gordonii*、*F.nucleatum*、*P.gingivalis*和混合菌悬液(1:1:1),随后实验组分别加入100 μ L不同浓度 α -淀粉酶药液(终浓度:20、10、5、2.5、1、0.5、0.1 g/L),阳性对照组为0.2%氯己定,阴性对照组为BHI培养基,每组设3个复孔。重复上述实验,将 α -淀粉酶溶液换成D-精氨酸溶液(终浓度:512、256、128、64、32、16、8、4 mmol/L)静置培养48 h后PBS冲洗,结晶紫染色法测定各组生物膜在600 nm处的OD值。经统计分析,OD值最小所对应药液的最低浓度即为最小生物膜抑制浓度(MBIC)。

1.2.5 两药联合对多菌种生物膜的分散作用 在4块96孔板中建立48 h多菌种生物膜,48 h后PBS冲洗。采用微量棋盘稀释法,D-精氨酸从横排加入, α -淀粉酶从纵排加入,按浓度梯度由高至低分别加入各100 μ L药液。阳性对照组为0.2%氯己定,阴性对照组每孔加入BHI培养基和菌悬液各100 μ L。实验重复3次,通过结晶紫染色法检测600 nm处的OD值,并计算多菌种生物膜清除率:生物膜清除率=(阴性对照组OD₆₀₀-实验组OD₆₀₀)/阴性对照组OD₆₀₀×100%。筛选与阳性对照组(0.2%氯己定)清除

率相近的药物联合浓度,并与该浓度下两种药物单独作用的清除效果进行比较。

1.2.6 两药联合对多菌种生物膜的抑制作用 在4块96孔板中,各孔板每孔先加入100 μ L混合菌悬液,随后采用微量棋盘稀释法加药,D-精氨酸从横排加入, α -淀粉酶从纵排加入,按浓度梯度由高至低分别加入各100 μ L药液。阳性对照组为0.2%氯己定,阴性对照组为BHI培养基和菌悬液各100 μ L,静置培养48 h后PBS冲洗。实验重复3次,通过结晶紫染色法检测600 nm处的OD值,并计算多菌种生物膜抑制率:生物膜抑制率=(阴性对照组OD₆₀₀-实验组OD₆₀₀)/阴性对照组OD₆₀₀×100%。筛选与阳性对照组(0.2%氯己定)抑制率相近的药物联合浓度,并与该浓度下两种药物单独作用的抑制作用进行比较。

1.2.7 CLSM 评估两药联合应用对多菌种生物膜的分散及抑制作用 对于生物膜清除的测定研究,在共聚焦培养皿中加入1 000 μ L混合菌悬浮液,于37℃、厌氧环境下静置培养48 h,建立多菌种生物膜模型。随机分为5组($n=3$): α -淀粉酶组、D-精氨酸组、联合用药组(终浓度:1 g/L α -淀粉酶和32 mmol/L D-精氨酸)、阳性对照组(0.2%氯己定)、阴性对照组(含氯化血红素-Vk溶液的BHI培养基)。前3组药液终浓度通过上述实验确定,各组加药后静置培养30 min,分别检测各组对多菌种生物膜清除的影响。

对于生物膜抑制的测定研究,在共聚焦培养皿中加入500 μ L混合菌悬浮液,随机分为5组($n=3$): α -淀粉酶组、D-精氨酸组、联合用药组(终浓度:0.5 g/L α -淀粉酶和16 mmol/L D-精氨酸)、阳性对照组(0.2%氯己定)、阴性对照组(含氯化血红素-Vk溶液的BHI培养基)。前3组药液终浓度通过上述实验确定,在37℃、厌氧环境下静置培养48 h,分别检测各组对多菌种生物膜形成的抑制作用。

将上述各组样本吸除上清,避光加入1 mL SYTO-9/PI混合染液,用PBS漂洗2次,使用CLSM观察每组生物膜的情况,每个样本均随机选取3个视野进行观察。观察参数为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。应用Image J软件计算活细菌量(绿色荧光量)。

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, $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

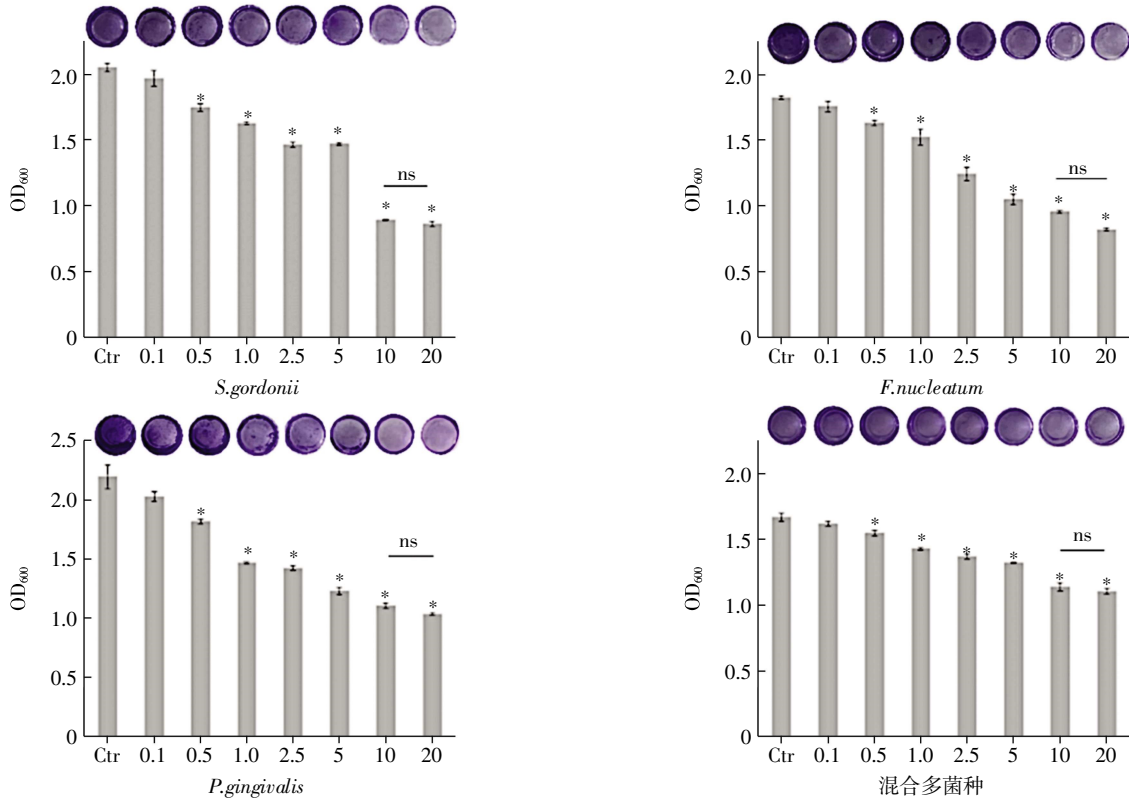
2 结果

2.1 α -淀粉酶和D-精氨酸对各致病菌及混合生物膜的分散作用 α -淀粉酶对*S.gordonii*、*F.nucleatum*、*P.gingivalis*及多菌种混合生物膜的MBEC均为10 g/L。除0.1 g/L组外,其余各浓度组 α -淀粉酶均能有效分散*S.gordonii*、*F.nucleatum*、*P.gingivalis*和多菌种生物膜($F=768.1$ 、 397.5 、 282.7 、 285.8 ,均 $P<0.05$,图1)。D-精氨酸对*S.gordonii*、*F.nucleatum*、*P.gingivalis*和多菌种生物膜的MBEC均为128 mmol/L。除4 mmol/L组外,其余各浓度组D-精氨酸均能有效分散*S.gordonii*、*F.nucleatum*和*P.gingivalis*生物膜($F=502.1$ 、 304.9 、 832.7 ,均 $P<0.05$);除2 mmol/L组外,其余各浓度组D-精氨酸均能有效分散多菌种生物膜($F=817.7$, $P<0.05$,图2)。

2.2 α -淀粉酶和D-精氨酸对各致病菌及混合生物膜的抑制作用 α -淀粉酶对*S.gordonii*、*F.nucleatum*、*P.gingivalis*及多菌种混合生物膜的MBIC均为10 g/L。各浓度的 α -淀粉酶均可抑制*F.nucleatum*生物膜的形成($F=114.1$, $P<0.05$)。除0.1 g/L组外,其余各浓度组 α -淀粉酶均能有效抑制*S.gordonii*、*P.gingivalis*和多菌种生物膜的形成($F=122.4$ 、 833.1 、 176.9 ,均 $P<0.05$,图3)。D-精氨酸对*S.gordonii*、*F.nucleatum*和*P.gingivalis*生物膜的MBIC为128 mmol/L,对多菌种生物膜的MBIC为256 mmol/L。除2 mmol/L组外,其余各浓度组D-精氨酸均能有效抑制*S.gordonii*和*F.nucleatum*生物膜的形成($F=162.8$ 、 331.3 ,均 $P<0.05$),除4 mmol/L组外,其余各浓度组D-精氨酸均能有效抑制*P.gingivalis*和多菌种生物膜的形成($F=708.5$ 、 824.1 ,均 $P<0.05$,图4)。

2.3 两药联合对多菌种生物膜的分散作用 阳性对照组0.2%氯己定对多菌种生物膜的清除率为(54.04±0.41)%。可获得与其相当清除率的最低联合用药浓度为 α -淀粉酶(1.0 g/L)和D-精氨酸(32 mmol/L),清除率为(54.18±0.12)% (表1),且联合用药的生物膜分散作用显著优于单独用药($F=997.8$, $P<0.001$,图5)。

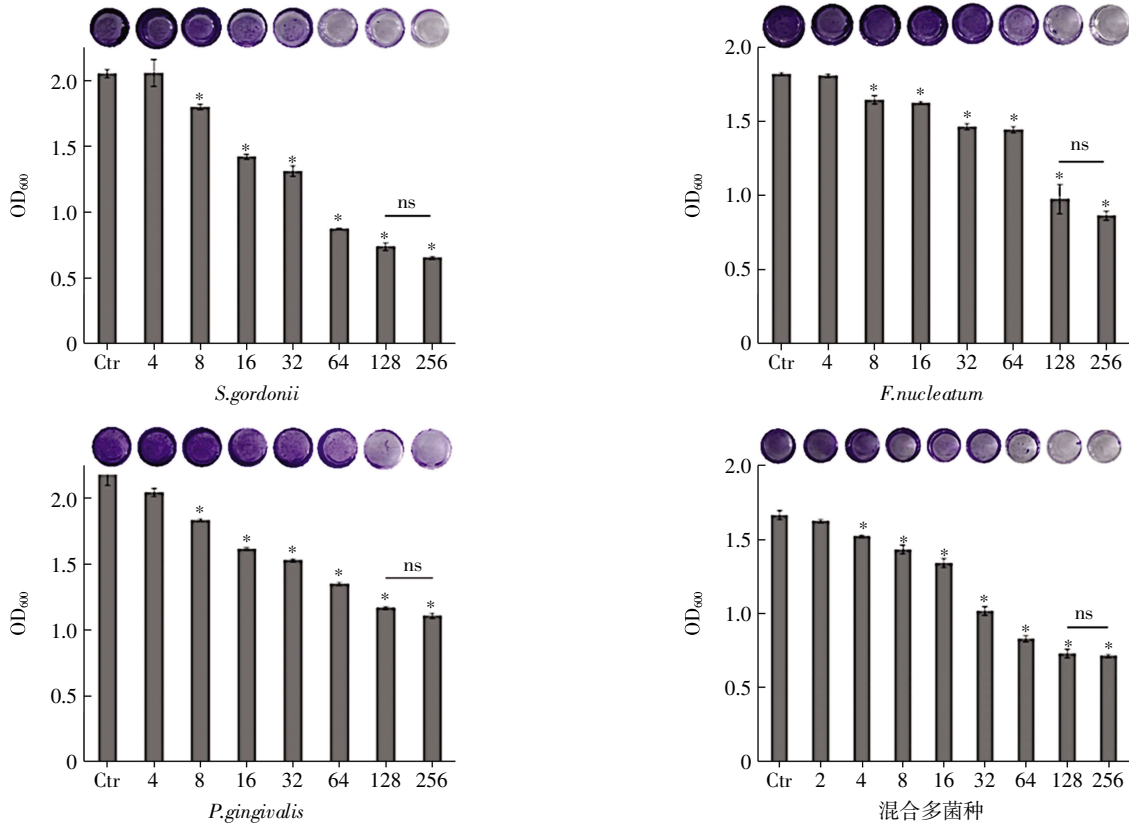
2.4 两药联合对多菌种生物膜的抑制作用 阳性对照组0.2%氯己定对多菌种生物膜的抑制率为(66.52±0.21)%。可获得与其相当抑制率的最低联合用药浓度为 α -淀粉酶(0.5 g/L)和D-精氨酸(32 mmol/L),抑制率为(68.69±0.22)% (表2),且联合用药的生物膜形成抑制作用显著优于单独用药($F=633.9$, $P<0.001$,图5)。



注: Ctr: 阴性对照组; 与阴性对照组相比, *P<0.05; 组间比较, ns 表示无差异

图 1 不同浓度的 α -淀粉酶对各致病菌及混合生物膜的分散作用

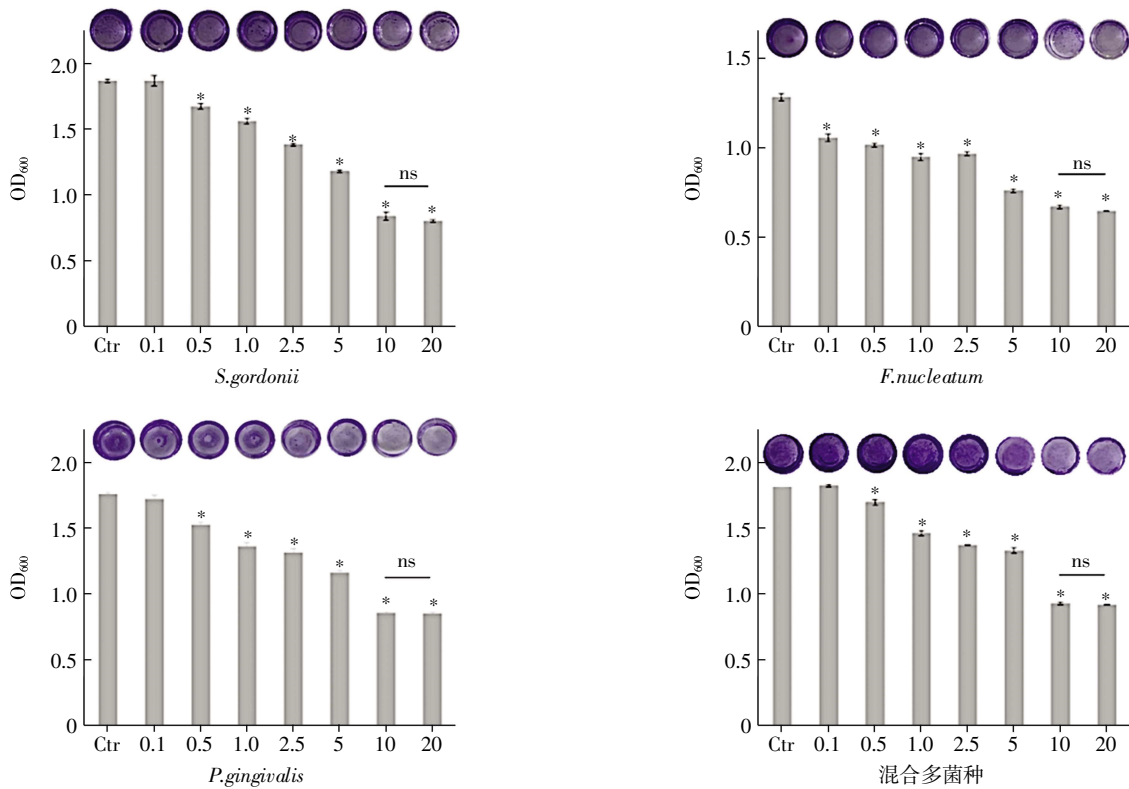
Fig.1 Dispersion effect of different concentrations of α -amylase on diverse pathogenic bacterium and multispecies biofilms



注: Ctr: 阴性对照组; 与阴性对照组相比, *P<0.05; 组间比较, ns 表示无差异

图 2 不同浓度的 D-精氨酸对各致病菌及混合生物膜的分散作用

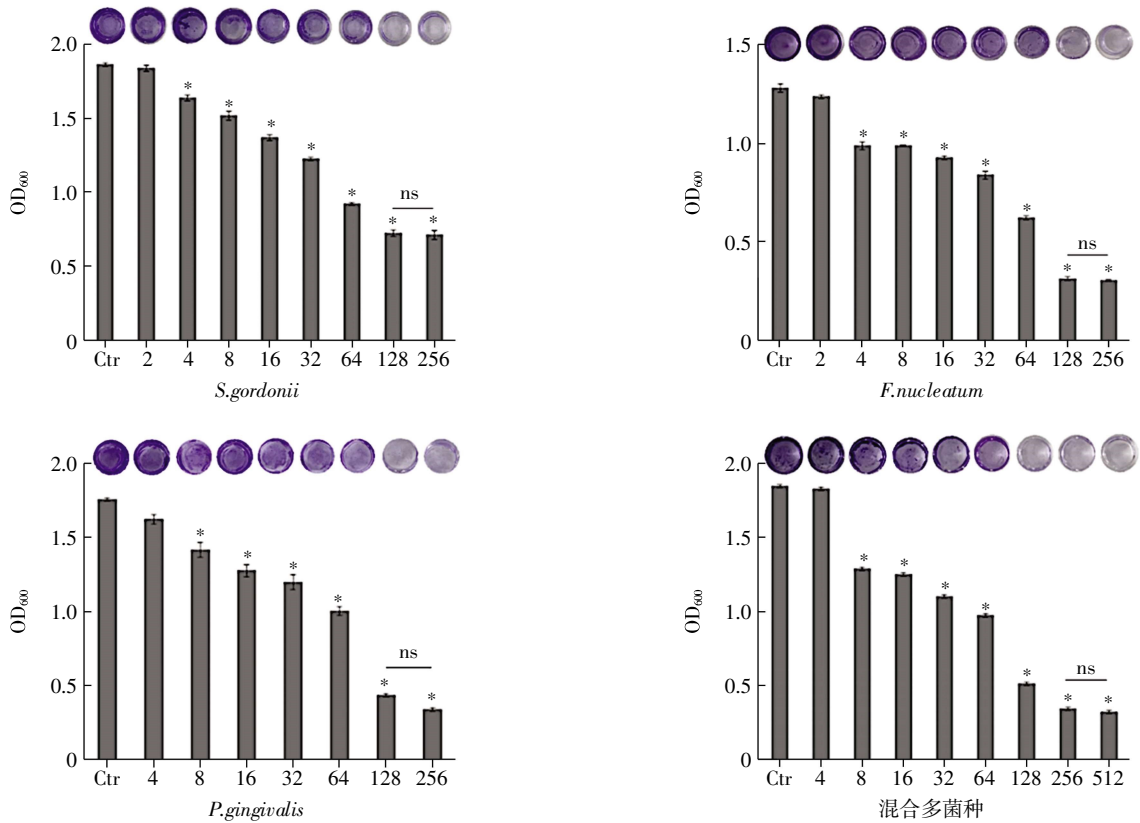
Fig.2 Dispersion effect of different concentrations of D-arginine on diverse pathogenic bacteria and multispecies biofilms



注: Ctr: 阴性对照组; 与阴性对照组相比, * $P < 0.05$; 组间比较, ns 表示无差异

图 3 不同浓度的 α -淀粉酶对各致病菌及混合生物膜的抑制作用

Fig.3 Inhibition effect of different concentrations of α -amylase on diverse pathogenic bacterium and multispecies biofilms



注: Ctr: 阴性对照组; 与阴性对照组相比, * $P < 0.05$; 组间比较, ns 表示无差异

图 4 不同浓度的 D-精氨酸对各致病菌及混合生物膜的抑制作用

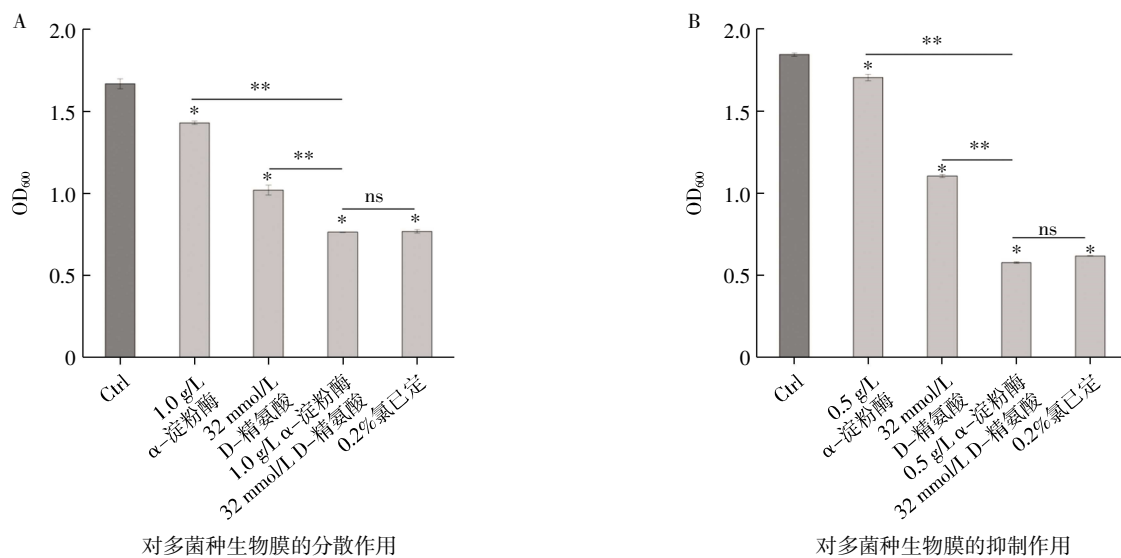
Fig.4 Inhibition effect of different concentrations of D-arginine on diverse pathogenic bacteria and multispecies biofilms

表1 α -淀粉酶和D-精氨酸联合应用对多菌种生物膜的清除率(%)Tab.1 The clearance rate of multispecies biofilms by the combined application of α -amylase and D-arginine (%)

D-精氨酸(mmol/L)	α -淀粉酶(g/L)					0.2%氯己定
	10	5	2.5	1	0.5	
128	66.81±0.09	67.01±0.03	65.81±0.15	61.29±0.07	59.81±0.12	54.04±0.41
64	58.11±0.03	57.11±0.09	55.46±0.12	54.62±0.06	54.28±0.03	
32	58.37±0.12	56.30±0.10	55.72±0.12	54.18±0.12	38.39±0.14	
16	44.30±0.06	36.31±0.18	34.33±0.54	29.20±0.87	25.98±0.36	
8	36.53±0.17	28.62±0.51	25.58±0.21	22.32±0.07	20.50±0.16	
4	36.91±0.07	26.72±0.21	20.76±0.07	20.04±0.48	16.23±0.68	

表2 α -淀粉酶和D-精氨酸联合应用对多菌种生物膜的抑制率(%)Tab.2 The inhibitory rate of multispecies biofilms by the combined application of α -amylase and D-arginine (%)

D-精氨酸(mmol/L)	α -淀粉酶(g/L)					0.2%氯己定
	10	5	2.5	1	0.5	
256	87.37±0.06	86.87±0.08	85.18±0.03	84.37±0.03	84.35±0.06	66.52±0.21
128	83.96±0.06	81.03±0.11	80.72±0.03	80.09±0.03	77.74±0.03	
64	81.70±0.03	79.35±0.05	78.19±0.03	76.64±0.05	72.39±0.03	
32	80.74±0.08	77.00±0.06	76.80±0.19	73.46±0.14	68.69±0.22	
16	78.19±0.11	76.06±0.12	74.11±0.03	69.03±0.09	58.75±0.06	
8	72.30±0.09	70.51±0.06	37.76±0.22	35.00±0.19	20.81±0.24	



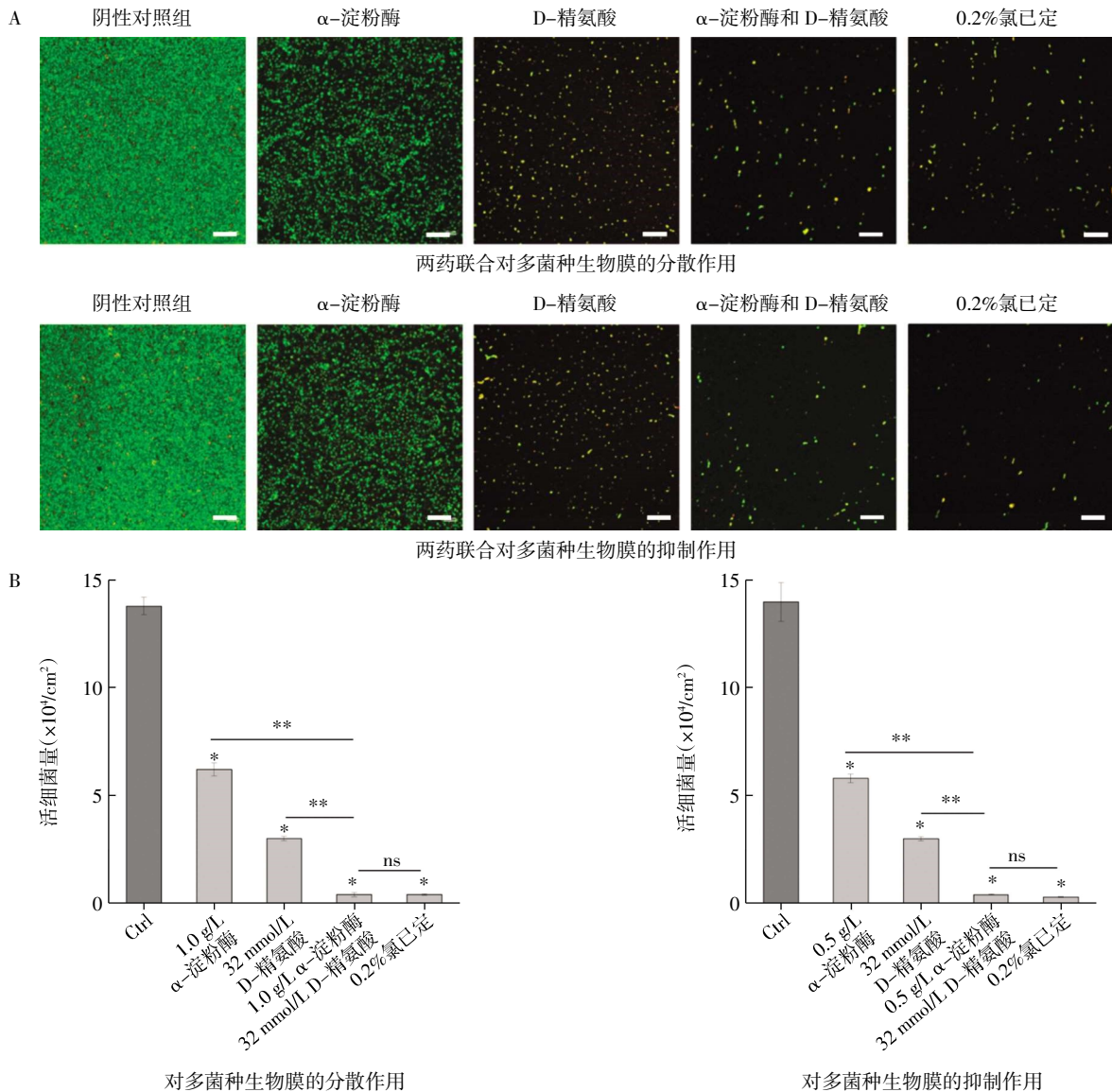
注: Ctrl: 阴性对照组; 与阴性对照组相比, * P <0.05; 组间比较, ** P <0.001, ns 表示无差异

图5 所选取的药物浓度对多菌种生物膜的分散和抑制作用

Fig.5 Dispersion and inhibition effect of multispecies biofilms by selected drug concentrations

2.5 CLSM 观察两药联合对多菌种生物膜的分散和抑制作用 进一步应用荧光染色法评估 α -淀粉酶联合 D-精氨酸对多菌种生物膜的分散和抑制作用(图 6)。绿色荧光显示为活菌,红色荧光为死菌。CLSM 图像可见阴性对照组细菌密集并完全覆盖样本表面,表明成功构建了多菌种生物膜模型。单药物和两药联合处理组均可见细菌散在分布。在分散作用研

究中,与 1.0 g/L α -淀粉酶组和 2 mmol/L D-精氨酸组相比,两药联合处理样本后的活细菌量最少($F=781.3$, $P<0.001$),且与 0.2% 氯己定组间无统计学差异($P>0.05$,图 6)。在抑制作用研究中,与 0.5 g/L α -淀粉酶组和 32 mmol/L D-精氨酸组相比,两药联合处理样本后的活细菌量最少($F=362.5$, $P<0.001$),且与 0.2% 氯己定组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 6)。



注:A:CLSM 图像,SYTO-9/PI 染色,200 \times ,白色标尺代表 50 μ m;B:活细菌量统计学分析,Ctrl:阴性对照组;与阴性对照组相比,* P <0.05;组间比较,** P <0.001,ns 表示无差异

图 6 药物联合应用对多菌种生物膜影响的 CLSM 图像及活细菌量统计学分析

Fig.6 CLSM images of the effect of drug co-application on multispecies biofilms and statistical analysis of viable bacterial counts

3 讨论

牙周炎是由多种病原微生物共同作用引发的复杂性、动态性疾病,细菌生物膜作为一种高度有序的微生物群落,不仅为病原菌提供了稳定的生态环境,而且通过复杂的信号传递和代谢活动,导致牙周支持组织的渐进性破坏^[13]。在菌斑生物膜形成过程中,*S.gordonii* 作为主要的致病菌之一,通常是早期定植者^[14]。此外,*F.nucleatum* 是牙周袋及感染根管等口腔部位的优势菌,其通过表达多种黏附素,发挥了关键的桥梁作用,增强不同菌种之间的共聚集能力、促进了细菌的黏附以及菌斑生物膜成熟^[15]。*P.gingivalis* 是牙周组织感染最重要的致病菌,在慢性牙周炎患者的龈下菌斑样本中检出率高达

85.75%,其分泌的致病物质,如荚膜多糖、脂多糖和牙龈蛋白酶等,能够直接破坏牙周组织^[16-17]。牙菌斑生物膜作为一个典型的多元微生物群落,通过菌间代谢产物与基因表达的相互作用,增强了生物膜的产量、毒力和稳定性,显著提升其环境适应性和致病潜能^[18]。因此,本研究拟构建由 *S.gordonii*、*F.nuceatum* 和 *P.gingivalis* 组成的多菌种生物膜模型,以更贴近临床实际,模拟多种致病菌间的相互作用。CLSM 图像显示 3 种细菌密集分布并完全覆盖在样本表面,验证该多菌种生物膜模型在体外构建成功。

生物膜总生物量中约 90%为 EPS,其不仅为细菌提供营养,还构成保护屏障,有效抵御药物渗透和外部剪切力^[19-20]。即使细菌被药物清除,残余 EPS

仍可牢固附着于表面^[21]。靶向干预 EPS 可突破传统牙周治疗的局限,提升疗效。研究表明,使用 α -淀粉酶溶液处理金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生物膜,可将生物膜中的多糖成分水解为低聚糖,从而分散生物膜,并促进伤口愈合^[22-23]。本研究结果同样证实 α -淀粉酶对牙周致病菌单菌种和多菌种生物膜均具有良好的分散和抑制作用。但 0.1 g/L α -淀粉酶不能有效分散和抑制多菌种生物膜,考虑较低浓度的酶可能难以有效作用于基质中的多糖,导致无法实现对生物膜结构的有效破坏。因此,本实验引入 D-精氨酸,联合 α -淀粉酶从不同 EPS 成分靶点出发,共同作用于生物膜。近年来,D-氨基酸在牙周致病菌生物膜研究中亦备受关注^[24],D-精氨酸联合 D-甲硫氨酸和 D-组氨酸可抑制 *P.gingivalis* 生物膜的形成并促进分散^[25]。研究证明,D-精氨酸在 ≥ 50 mmol/L 和 100 mmol/L 浓度下分别能有效减少 *P.gingivalis* 生物量积累和促进生物膜分散^[26]。与传统抗菌药物相比,D-精氨酸结构稳定,不易产生耐药性,具有良好的抗菌活性和较低的毒性^[27]。本研究结果显示,D-精氨酸对多菌种生物膜的 MBEC 为 128 mmol/L,MBIC 为 256 mmol/L,证实其可有效促进牙周致病菌生物膜的分散,并且抑制生物膜的形成。

高浓度的 α -淀粉酶和 D-精氨酸的安全性问题不容忽视。Li 等^[21]研究发现,高于 1.0 g/L 浓度时, α -淀粉酶对 MC3T3-E1 细胞具有一定的细胞毒性。本实验采用的联合用药策略在发挥对多菌种生物膜分散与抑制作用的同时,实现相较单药使用时更低的药物浓度,减少药物不良反应。结果显示,当 1.0 g/L α -淀粉酶和 32 mmol/L D-精氨酸联合应用时,其对多菌种生物膜的清除率达到与 0.2% 氯己定相当的效果。当联合药物浓度为 0.5 g/L α -淀粉酶和 32 mmol/L D-精氨酸时,其对多菌种生物膜抑制率数值与 0.2% 氯己定相当。这表明联合应用两种药物在低浓度且安全的条件下,可达到与 0.2% 氯己定相当的生物膜分散和抑制效果,具有良好的临床应用前景。此外,在 D-精氨酸浓度为 32 mmol/L 时,分散生物膜所需的 α -淀粉酶浓度高于抑制所需浓度的 2 倍。随着生物膜的成熟,浮游细菌在初期黏附后逐渐形成结构更复杂的生物膜,其 EPS 各组分含量显著增加,因此需要更高浓度的 α -淀粉酶才能实现有效降解与生物膜结构破坏。CLSM 图像显示阴性对照组中细菌密集分布并完全覆盖表面,而单独应用 α -淀粉酶时细菌分布呈散在状且细菌间存在明显间距,提示低剂量 α -淀粉酶可部分降解 EPS,使生物膜结构松散,但对细菌数量的减少效果

有限。但当联合 32 mmol/L D-精氨酸后,其对多菌种生物膜的分散和抑制作用均增强,CLSM 图像可见细菌呈现散在分布,活细菌数量显著减少,且与 0.2% 氯己定组中活细菌量无统计学差异。结果证实, α -淀粉酶和 D-精氨酸联合应用可有效分散并抑制多菌种生物膜,显示良好的协同效应。但二者联合对生物膜的协同作用机制还需进一步研究。

综上所述,低浓度 α -淀粉酶联合 D-精氨酸在促进牙周主要致病菌构成的多菌种生物膜的分散和抑制方面表现出良好的效果,其效果与 0.2% 氯己定相当,有效维持菌群生态平衡,在牙周炎的药物治理中具有潜在的重要应用价值。

参考文献:

- [1] ZHANG M, LIU Y, AFZALI H, et al. An update on periodontal inflammation and bone loss[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1385436.
- [2] DI STEFANO M, POLIZZI A, SANTONOCITO S, et al. Impact of oral microbiome in periodontal health and periodontitis: a critical review on prevention and treatment[J]. *Int J of Mol Sci*, 2022, 23 (9): 5142.
- [3] WU X, WANG L, LU Y, et al. A microenvironment-responsive graphdiyne-iron nanozyme hydrogel with antibacterial and anti-inflammatory effect for periodontitis treatment[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 20: e2403683.
- [4] GRAZIANI F, KARAPETSA D, ALONSO B, et al. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease?[J]. *Periodontol 2000*, 2017, 75(1): 152-188.
- [5] POPPOLO DEUS F, OUANOUNOU A. Chlorhexidine in dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects[J]. *Int Dent J*, 2022, 72 (3): 269-277.
- [6] TIAN S, SU L, LIU Y, et al. Self-targeting, zwitterionic micellar dispersants enhance antibiotic killing of infectious biofilms—an intravital imaging study in mice[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(33): eabb1112.
- [7] ZANATTA F B, ANTONIAZZI R P, RÖSING C K. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial[J]. *J Periodontol*, 2007, 78(11): 2127-2134.
- [8] REDMAN W K, WELCH G S, WILLIAMS A C, et al. Efficacy and safety of biofilm dispersal by glycoside hydrolases in wounds[J]. *Biofilm*, 2021, 3: 100061.
- [9] PRAKASH O, JAISWAL N. Alpha-amylase: an ideal representative of thermostable enzymes[J]. *App Biochem Biotechnol*, 2010, 160 (8): 2401-2414.
- [10] FULAZ S, VITALE S, QUINN L, et al. Nanoparticle-biofilm interactions: the role of the EPS matrix[J]. *Trends Microbiol*, 2019, 27 (11): 915-926.
- [11] KOLODKIN-GAL I, ROMERO D, CAO S, et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly[J]. *Science*, 2010, 328(5978): 627-629.
- [12] LAM H, OH D C, CAVA F, et al. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria[J]. *Science*, 2009, 325(5947): 1552-1555.

- [13] JAKUBOVICS N S, GOODMAN S D, MASHBURN-WARREN L, et al. The dental plaque biofilm matrix[J]. *Periodontol*, 2000, 2021, 86(1): 32-56.
- [14] CHOO S W, MOHAMMED W K, MUTHA N V R, et al. Transcriptional responses to coaggregation between *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus oralis*[J]. *App Environ Microbiol*, 2024, 87(22): e0155821.
- [15] BRENNAN C A, GARRETT W S. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 156-166.
- [16] WANG S, YAN T, ZHANG B, et al. *Porphyromonas gingivalis* vaccine: antigens and mucosal adjuvants[J]. *Vaccines*, 2024, 12(6): 619.
- [17] BREGAINT S, BOYER E, FONG S B, et al. *Porphyromonas gingivalis* outside the oral cavity[J]. *Odontology*, 2022, 110(1): 1-19.
- [18] ABDULKAREEM A A, AL-TAWEEL F B, AL-SHARQI A J B, et al. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis[J]. *J Oral Microbiol*, 2023, 15(1): 2197779.
- [19] PINTO R M, SOARES F A, REIS S, et al. Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 952.
- [20] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623-633.
- [21] LI B, CAI Q, WANG Z, et al. D-arginine enhances the effect of α -amylase on disassembling *actinomyces viscosus* biofilm[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 864012.
- [22] FLEMING D, CHAHIN L, RUMBAUGH K. Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(2): e0199816.
- [23] WATTERS C M, BURTON T, KIRUI D K, et al. Enzymatic degradation of *in vitro* *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma[J]. *Infect Drug Resist*, 2016, 9: 71.
- [24] QI H, LI B, WANG H, et al. Effects of D-valine on periodontal or peri-implant pathogens: *Porphyromonas gingivalis* biofilm[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(3): 303-314.
- [25] ZHANG Z, LI B, CAI Q, et al. Synergistic effects of D-arginine, D-methionine and D-histidine against *Porphyromonas gingivalis* biofilms[J]. *Biofouling*, 2021, 37(2): 222-234.
- [26] LI Y Y, LI B S, LIU W W, et al. Effects of D-arginine on *Porphyromonas gingivalis* biofilm[J]. *J Oral Sci*, 2020, 62(1): 57-61.
- [27] CAVA F, LAM H, DE PEDRO M A, et al. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 68(5): 817-831.

(2025-03-17 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机断层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部