



落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷抑制变异链球菌生长和生物膜形成的作用研究

张耀超^{*}, 左艳萍, 周芳, 唐成芳, 张琳梅

西安医学院口腔医学院, 陕西 西安 710075

摘要:【目的】研究落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生长和生物膜形成的影响。【方法】四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)用于分析落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜形成的影响;用氧敏感性测试法检测落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌氧敏感性的影响;用 Real-time PCR 方法检测基因的 mRNA 水平;采用人单核细胞检测了落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷的细胞毒性。【结果】落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷能显著抑制变异链球菌的生长和生物膜形成,而这种抑制作用呈现浓度依赖性。Real-time PCR 实验发现,50 μg/mL 落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷作用的生物膜中, *brpA* (transcriptional regulator)、*recA* (recombinase A)、*nth* (endonuclease III)、*luxS* (S-ribosylhomocysteinase)、*ffh* (fifty four homologue)、*smx* (sulfamethoxazole)、*gtfB* (glucosyltransferase-I) 和 *gtfC* (glucosyltransferase-SI) 的 mRNA 表达水平均显著降低。同时研究发现,25、50、75 μg/mL 的落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷对人单核细胞的生长和 LDH 活性均无影响。【结论】落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷具有抑制变异链球菌生长和生物膜形成的作用,分子水平可以下调 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* 等生物膜形成相关基因的 mRNA 表达水平,同时研究发现其无细胞毒性,因此有望成为抗菌治疗的潜在药物。

关键词: 落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷, 生物膜, 变异链球菌, 抗菌

龋齿是与细菌生物膜形成相关的口腔感染性疾病,严重影响人们的口腔和身体健康。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)是龋齿最关键的病原菌,其在牙齿表面定殖并导致牙齿脱矿,是牙菌斑生物膜的重要组成部分^[1-3]。变异链球菌

通过其表面的黏结素,识别并结合唾液凝集素和酸性富脯蛋白,介导变异链球菌附着于牙齿表面形成牙菌斑,进而将生物膜中的一些糖类代谢为酸类物质,降低微环境中的 pH 值,导致牙釉质脱矿,产生龋齿^[4]。因此,研究开发抑制变异链球菌

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划(18JK0656)

*通信作者。E-mail: zhangyc@xiyi.edu.cn

收稿日期:2019-11-27;修回日期:2020-01-15;网络出版日期:2020-03-09

的增殖和抑制生物膜形成的药物和方法对于龋齿治疗具有重要意义。

目前大量研究致力于抗变异链球菌生物膜形成的药物研发。Chen 等发现抗微生物肽 LL-37 的衍生物 IG-13-1 和 IG-13-2 通过破坏细菌细胞膜引起细胞内成分外泄而导致细菌死亡,进而抑制变异链球菌生物膜的形成。在分子水平 IG-13-1 和 IG-13-2 可抑制炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)的表达^[5]。研究发现天竺葵甲醇提取物具有显著的抗变异链球菌活性,其中根提取物的抗菌作用最强^[6]。Bach 等发现从越南毛杜鹃叶分离到的罗丹明酮通过抑制细菌细胞膜上质子移位膜 ATP 酶(membrane-bound proton translocating ATPase, F-ATPase)和磷酸转移酶系统的活性可以降低变异链球菌的产酸和糖酵解能力,并抑制变异链球菌生物膜的形成^[7]。Phillip 等发现蔓越莓乳香酚提取物具有很强的降低变异链球菌代谢活性,抑制酸生成和生物膜形成的功能^[8]。此外,姜黄素和抗菌肽也已被应用于口腔生物学的研究^[9-10]。

落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷是从板蓝根中提取的一种木质素,而板蓝根常用于感染、感冒、发热和炎症性疾病等的治疗。已有研究发现落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对流感病毒 A/PR/8/34(H1N1)具有强烈的抑制作用,分子机制上落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷通过下调 H1N1 流感病毒感染诱导的 TNF- α 、IL-6 和 IP-10 等分子发挥作用^[11-12]。本研究发现落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷可抑制变异链球菌生物膜生长,并进一步研究了其调控机制和生物毒性。

1 材料和方法

1.1 材料准备和细菌培养

变异链球菌 UA159 由中国科学院微生物研究所赠送,采用脑心浸液培养基(brain-heart infusion, BHI, Difco, 美国)培养(95%空气, 5% CO₂)。

落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷购自美国 Sigma-Aldrich 公司(货号: PHL83536)。

1.2 生长曲线测定

生长曲线测定根据文献报道方法进行^[13]。以培养于 BHI 培养基的细菌悬液作为对照组,落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷加入细菌悬液使终浓度为 10 μ g/mL 和 50 μ g/mL 作为处理组,然后 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h,每 4 h 取等量的培养体系采用 PBS 缓冲液稀释 10 倍后接种于 BHI 固体培养基。37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h 后,计数克隆形成单位(colony forming units, CFUs),并绘制生长曲线。本实验重复 3 次。

1.3 变异链球菌生物膜形成检测

变异链球菌生物膜形成实验根据文献报道方法进行^[14]。将-80 $^{\circ}$ C 保存的变异链球菌复苏,培养于 BHI 培养基,将变异链球菌液接种到 96 孔板(100 μ L/孔)。在生物膜形成实验中,采用不同浓度的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷(0, 1, 5, 10, 25, 50 和 75 μ g/mL)进行处理,对照组采用相同体积的去离子水处理。培养 4 到 24 h 后,去除培养基,使用 PBS (pH 7.0)仔细清洗 3 次。落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理组和对照组的生物膜生存率使用 MTT 法检测。每孔加入 100 μ L MTT 试剂(2 mg/mL MTT, Sigma-Aldrich, 美国),避光 37 $^{\circ}$ C 处理 3 h,然后轻轻去除 MTT 试剂,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷溶解细胞内甲酰胺晶体。最后使用酶

标仪于 490 nm 进行检测。本实验重复 3 次。

1.4 RNA 提取和定量 PCR 检测

变异链球菌过夜培养后, 采用新鲜的 BHI 培养基稀释并接种到 24 孔板, 设置 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理组和对照组, 厌氧培养 24 h 后, 5000 r/min 离心 5 min, 收取细菌, 并采用无菌的 PBS 洗涤 2 次。

RNA 提取: 加入溶菌酶(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)并超声裂解 12 s, 然后采用 TRIzol (Thermo Scientific, 美国) 抽提变异链球菌的总 RNA。采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, 美国) 进行逆转录反应后, 采用实时定量 PCR 方法检测 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* 基因的 mRNA 水平, 16S rRNA 作为内参。PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 32 s。PCR 反应在 ABI7300 实时定量 PCR 仪上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算相对表达量。引物序列如下: *luxS* 上游引物(82–105): 5'-GAGTTTGGACCTAAAGGCGATCTT-3', 下游引物(370–394): 5'-CTTTGTAATCCACAGGAC TCAAT-3'; *brpA* 上游引物(469–488): 5'- GAAGGG CTGGTTCAGTTGGT-3', 下游引物(861–883): 5'- CACCGTCAATAGTCGTTCTTCT-3'; *ffh* 上游引物 (887–907): 5'-TGGGAATGGGAGACTTGCTT A-3', 下游引物(1172–1191): 5'- GCTCGGAGTTAG GAGGTCAG-3'; *recA* 上游引物(345–366): 5'- CCAGATTCAGGAGAACAGGGTC-3', 下游引物 (800–822): 5'-ATTCACCTGTACGAGAAATGCC T-3'; *nth* 上游引物(50–71): 5'- CGCTTTATCCAGA TGCTGTTCC-3', 下游引物(419–439): 5'- AAATAC GGCTGACATGGGTGT-3'; *smx* 上游引物(140–159): 5'-TATCTGCCAAAGGTCCCACG-3', 下游引物

(538–556): 5'-AACGGCGATTGGAAGAAGG-3'; *gtfB* 上游引物(407–425): 5'-AAACAACCGAAGCT GATAC-3', 下游引物(475–496): 5'-CAATTTCTTT TACATTGGGAAG-3'; *gtfC* 上游引物(2362–2383): 5'- GTGCGCTACACCAATGACAGAG-3', 下游引物(2447–2469): 5'-GCCTACTGGAACCCAAACAC CTA-3'; 16S rRNA 上游引物(314–333): 5'- GCAGTAGGGAATCTTCGGCA-3', 下游引物 (778–802): 5'-GTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCA C-3'。本实验重复 3 次。

1.5 氧敏感性检测

96 孔板中加入 100 μL 变异链球菌悬液。生物膜形成方法同上, 采用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理。生物膜生长 72 h 后, 加入 0.2% 的过氧化氢(58.8 mmol/L, Sigma-Aldrich, 美国)分别处理 30、60 和 120 min。生物膜生存率采用 MTT 法检测。本实验重复 3 次。

1.6 细胞毒性检测

人单核细胞系 THP(ATCC, 美国)用于检测落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷的细胞毒性^[15]。第一类实验接种单核细胞到 6 孔板(每孔 10^5 细胞), 培养基中加入终浓度 25、50 和 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷进行培养; 第二类实验接种单核细胞到 6 孔板(每孔 10^5 细胞), 然后感染变异链球菌(10^6 CFU)并在培养基中加入终浓度 25、50 和 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷进行培养。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下处理 24 h 后, 采用台盼蓝排斥实验进行检测。离心收集细胞, 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基重悬细胞。然后取 100 μL 细胞悬液与等体积的台盼蓝溶液混合, 冰上处理 5 min, 然后在显微镜下计数细胞。细胞存活率为: 未染色细胞/(染色细胞+未染色细

胞)。本实验重复 3 次。

1.7 乳酸脱氢酶(LDH)活性分析

乳酸脱氢酶活性检测按照文献报道方法进行^[15]。接种单核细胞到 6 孔板(每孔 10^6 细胞), 然后感染变异链球菌(10^6 CFU)并在培养基中加入终浓度 25、50 和 75 $\mu\text{g/mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷进行培养。在 37 °C 和 5% CO_2 条件下处理 24 h 后, 收集培养基检测 LDH 活性(Promega, 美国)。取 50 μL 培养基置于 96 孔板, 并加入 50 μL 底物溶液后混匀, 常温避光处理 30 min。然后加入 50 μL 酸溶液终止反应。采用酶标仪在 490 nm 处采集数据。本实验重复 3 次。

1.8 统计分析

所有数据表示为平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), 采用 Graphpad 软件 6.0 版本进行统计分析, 多组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较使用 T 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生长和生物膜形成的影响

采用 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理变异链球菌 4 到 24 h 时, 结果发现 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷均可以显著抑制变异链球菌的生长。作用 24 h 后, 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生长的抑制率分别为 29.9% 和 46.6% ($P<0.05$)(图 1)。

接着实验研究了落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜形成的影响。结果(图 2)发现在作用 4 h 和 24 h 后, 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 75 $\mu\text{g/mL}$ 落

叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷几乎全部抑制了生物膜的形成, 具体为 4 h 后 50 和 75 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜形成的抑制率(%)分别为 99.03 ± 2.58 和 99.13 ± 4.23 ($P=0.000$), 24 h 后 50 和 75 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜形成的抑制率(%)分别为 99.23 ± 2.87 和 99.76 ± 4.93 ($P=0.000$)。作用 24 h 后, 25 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对生物膜形成的抑制率(%)为

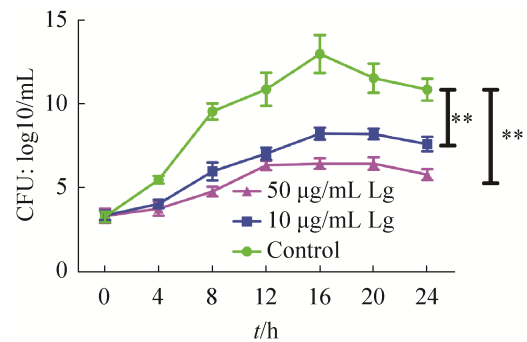


图 1. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理组(10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$)和对照组变异链球菌生长曲线对比

Figure 1. Comparison of the growth curve of *Streptococcus mutans* in the Lg treated group (10 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$) and negative control group. **: $P<0.01$.

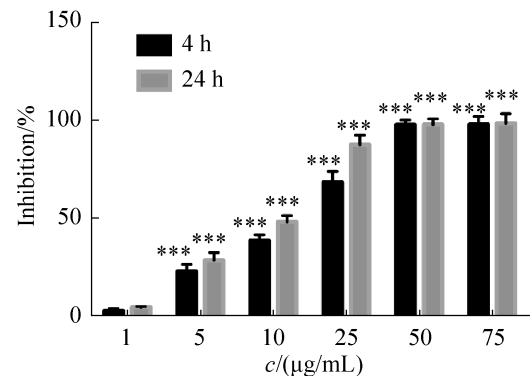


图 2. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理 4 h 和 24 h 后, 在 1、5、10、25、50、75 $\mu\text{g/mL}$ 浓度条件下检测生物膜抑制率

Figure 2. The inhibition rate of biofilm under the treatment of Lg at the concentration of 1, 5, 10, 25, 50, 75 $\mu\text{g/mL}$. ***: $P<0.001$.

88.97±4.87 ($P=0.000$), 10 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对生物膜形成的抑制率(%)为49.03±3.23 ($P=0.000$)(图 2)。这些结果表明落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生长和生物膜形成具有抑制作用。

2.2 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜氧敏感性的影响

实验进一步研究了落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理后对变异链球菌生物膜氧敏感性的影响。结果发现 50 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理后变异链球菌生物膜生存率在 0.2%的过氧化氢处理 0 到 120 min 时间内基本稳定,而对照组变异链球菌生物膜在 0.2%的过氧化氢处理后生存率显著下降, 60 min 后接近落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理组变异链球菌生物膜的生存率(图 3)。

2.3 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜形成相关基因的影响

Real-time PCR 检测发现, 与对照组相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理后可以显著下调生物膜形成相关基因 *brpA* (transcriptional

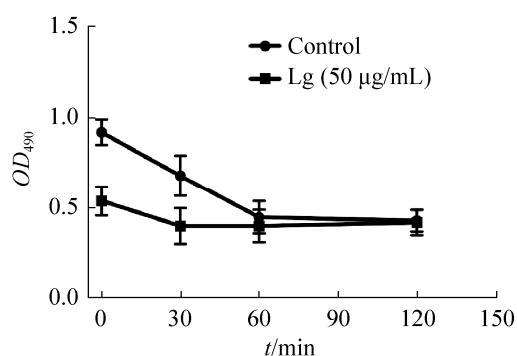


图 3. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌生物膜氧敏感性的影响

Figure 3. The effect of Lg on the oxygen sensitivity of *Streptococcus mutans* biofilm.

regulator)、*recA* (recombinase A)、*nth* (endonuclease III)、*luxS* (S-ribosylhomocysteinase)、*ffh*、*smx*、*gtfB* (glucosyltransferase-I)和 *gtfC* (glucosyltransferase-SI)的 mRNA 表达水平(图 4, P 值分别为 0.004、 <0.001 、0.001、0.005、0.002、0.001、0.004 和 0.002)。

2.4 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对单核细胞无毒性

采用台盼蓝排斥实验研究了落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对单核细胞存活率的影响。图 5 结果显示 25、50、75 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理组与对照组单核细胞的存活率类似($P>0.05$), 表明 25、50、75 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对单核细胞无毒性。实验同样检测了落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌感染的单核细胞存活率的影响。图 6 结果发现, 变异链球菌处理可以显著降低单核细胞的存活率, 而 25、50、75 $\mu\text{g/mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷均可以显著抑制变异链球菌感染对单核细胞存活率的下调作用。为了进一步确定落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷无细胞毒性, 实验检测了培养

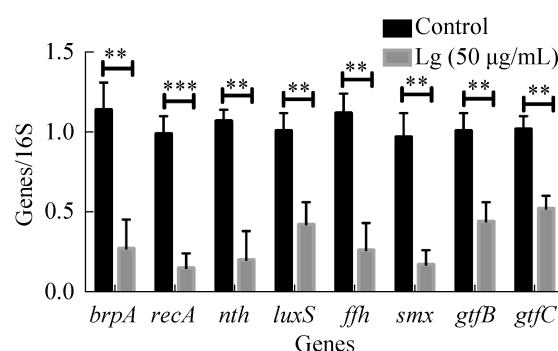


图 4. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷处理后 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* 的相对表达量
Figure 4. The relative expression of *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* after Lg treatment. ***: $P<0.01$; **: $P<0.001$.

基中 LDH 的活性。图 7 结果显示当变异链球菌感染单核细胞时，培养基中 LDH 的活性显著升高($P<0.05$)，而当采用 25、50、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$

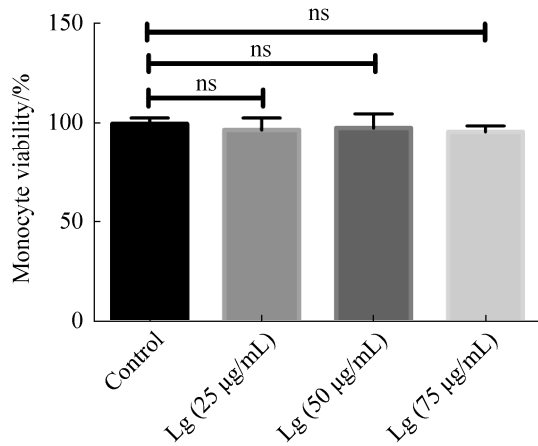


图 5. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对人单核细胞存活率的影响

Figure 5. The effect of Lg on the survival rate of human monocytes of 25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h.

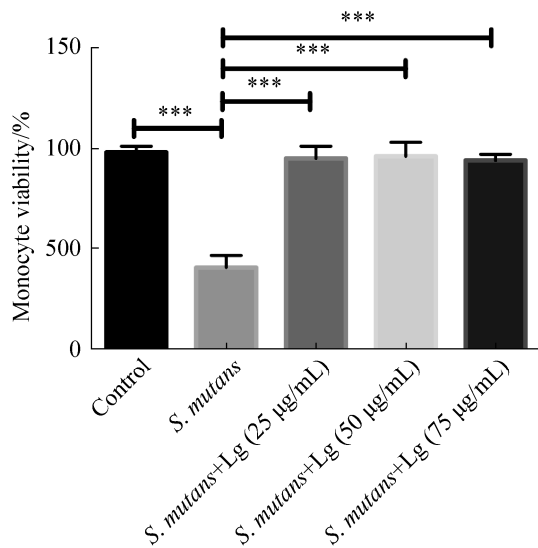


图 6. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌感染的人单核细胞存活率的影响

Figure 6. The effect of Lg on the survival rate of human monocytes infected with *Streptococcus mutans* of 25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. ***: $P<0.001$.

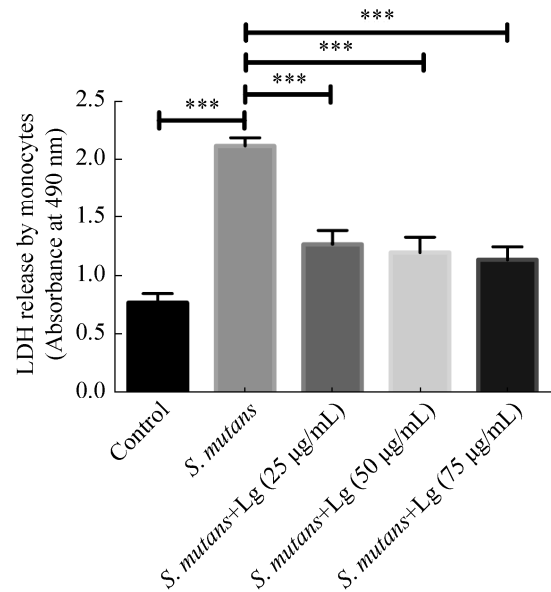


图 7. 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对人单核细胞培养基中 LDH 活性的影响

Figure 7. The effect of Lg on LDH activity in human monocyte culture medium of 25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. ***: $P<0.001$.

落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷分别处理变异链球菌感染的单核细胞后，培养基中的 LDH 活性显著降低($P<0.05$)。这些结果表明 25、50、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对单核细胞无毒性。

3 讨论

口腔中，变异链球菌形成的牙菌斑生物膜是龋齿发生的重要致病原因。因此，探索抑制生物膜形成的方法对于龋齿治疗具有重要意义。

截至目前，有大量研究集中于开发能抑制变异链球菌增殖和生物膜形成的药物，这些研究对龋齿的治疗意义重大。Cao 等发现人参皂苷 Rh2 (ginsenoside Rh2, GS-Rh2)可以抑制变异链球菌生长，并抑制胞外多糖合成和破坏细胞膜，发挥抑制细菌生物膜形成的作用^[16]。Hickl 等发现地中海草药提取物也具有显著抑制变异链球菌生物膜形

成的功能^[17]。Lavaee 等通过研究发现, 硫酸锌与盘尼西林和洗必泰类似具有抑制变异链球菌生长的作用, 而且在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 硫酸锌的抑制作用要显著好于乙酸锌^[18]。此外, 研究发现法尼醇可通过提高变异链球菌的氧敏感性, 降低生物膜形成相关基因表达水平来抑制龋齿的发生^[15]。落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷作为从板蓝根中提取的一种木质素, 对流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 具有强烈的抑制作用, 分子机制上落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷可以下调 H1N1 流感病毒感染诱导的 TNF- α 、IL-6 和 IP-10 等分子^[11-12]。本文结果发现落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对变异链球菌的生长和生物膜的形成具有抑制作用。

低 pH 值可启动变异链球菌的 DNA 修复机制, 以修复细胞内酸性环境引起的 DNA 损伤, 而研究发现重组酶 *RecA*、内切酶 *nth*、无嘌呤嘧啶内切酶 *smx* 和 *ffh* 基因参与该过程的调控^[19]。本实验结果发现落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷可下调变异链球菌生物膜形成相关基因 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* 的 mRNA 表达水平。此外 *luxS* 基因负责调节变异链球菌的氧化应激反应, 且 *luxS* 基因缺陷菌株表现出耐酸能力降低的现象^[20]。而我们的结果也发现落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷能下调变异链球菌生物膜中 *luxS* 基因的表达, 表明其抑制了变异链球菌的耐酸能力。综上所述, 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷通过降低 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh*、*smx*、*gtfB* 和 *gtfC* 的 mRNA 表达水平, 抑制了变异链球菌的生长和生物膜的形成。

临床应用中, 抗菌药物应确保对机体细胞无毒性。本研究中参考文献报道^[15]采用人单核细胞研究了落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷的毒性。结果发现 25、50、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落叶松脂醇-4- β -D-吡喃

葡萄糖苷既不影响人单核细胞的存活率, 也不影响单核细胞 LDH 的活性。这些结果表明落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷无细胞毒性。考虑到落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷对病毒具有强烈的抑制作用且存在一定的抗炎作用, 因此我们下一步将研究落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷是否对口腔微生态产生影响。

综上所述, 本研究结果表明落叶松脂醇-4- β -D-吡喃葡萄糖苷具有抑制变异链球菌生长和生物膜形成的作用, 分子水平可以下调 *brpA*、*recA*、*nth*、*luxS*、*ffh* 和 *smx* 等生物膜形成相关基因的 mRNA 表达水平, 同时研究发现其无细胞毒性, 因此有望成为抗菌治疗的潜在药物。

参 考 文 献

- [1] Guo JH, Jia R, Fan MW, Bian Z, Chen Z, Peng B. Construction and immunogenic characterization of a fusion anti-caries DNA vaccine against PAc and glucosyltransferase I of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 2004, 83(3): 266-270.
- [2] Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(3): 219-230.
- [3] Kuramitsu HK, He XS, Lux R, Anderson MH, Shi WY. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71(4): 653-670.
- [4] Chen Y, Zhang XF, Zhu JD. Experimental study on the inhibitory effect of decoction of *Bletilla striata* Reichb. f to *Streptococcus mutans*. *Chinese Journal of Conservative Dentistry*, 2007, 17(8): 452-454. (in Chinese)
陈玉, 张晓芳, 朱剑东. 中药白芨抑制变形链球菌的实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(8): 452-454.
- [5] Chen Z, Yang G, Lu SS, Chen DW, Fan S, Xu JY, Wu BL, He J. Design and antimicrobial activities of LL-37 derivatives inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Chemical Biology & Drug Design*, 2019, 93(6): 1175-1185.
- [6] Coronado-López S, Caballero-García S, Aguilar-Luis MA,

- Mazulis F, Del Valle-Mendoza J. Antibacterial activity and cytotoxic effect of *Pelargonium peltatum* (Geranium) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *International Journal of Dentistry*, 2018, 2018: 2714350.
- [7] Bach QN, Hongthong S, Quach LT, Pham TV, Kuhakarn C, Reutrakul V, Nguyen PTM. Antimicrobial activity of rhodomertone isolated from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. *Natural Product Research*, 2019, 1: 1–6. doi: 10.1080/14786419.2018.1540479.
- [8] Philip N, Bandara HMHN, Leishman SJ, Walsh LJ. Inhibitory effects of fruit berry extracts on *Streptococcus mutans* biofilms. *European Journal of Oral Sciences*, 2019, 127(2): 122–129.
- [9] Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2012, 30(2): 96–101.
- [10] Mai JN, Tian XL, Gallant JW, Merkley N, Biswas Z, Syvitski R, Douglas SE, Ling JQ, Li YH. A novel target-specific, salt-resistant antimicrobial peptide against the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(11): 5205–5213.
- [11] Zhou BX, Li J, Liang XL, Yang ZF, Jiang ZH. Transcriptome profiling of influenza A virus-infected lung epithelial (A549) cells with lariciresinol-4- β -D-glucopyranoside treatment. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173058.
- [12] Li J, Zhou BX, Li CF, Chen QY, Wang YT, Li ZT, Chen TT, Yang CG, Jiang ZH, Zhong NS, Yang ZF, Chen RC. Lariciresinol-4-O- β -D-glucopyranoside from the root of *Isatis indigotica* inhibits influenza A virus-induced pro-inflammatory response. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 174: 379–386.
- [13] Yue JX, Yang HY, Liu SY, Song FF, Guo JM, Huang C. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*, 2018, 76: 24–31.
- [14] Cao L, Zhang ZZ, Xu SB, Ma M, Wei X. Farnesol inhibits development of caries by augmenting oxygen sensitivity and suppressing virulence-associated gene expression in *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Research*, 2017, 31(4): 333–343.
- [15] Jannadi H, Correa W, Zhang Z, Brandenburg K, Oueslati R, Rouabhia M. Antimicrobial peptides Pep19-2.5 and Pep19-4LF inhibit *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 133: 103546.
- [16] Cao X, Ye Q, Fan M, Liu C. Antimicrobial effects of the ginsenoside Rh2 on monospecies and multispecies cariogenic biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(3): 740–751.
- [17] Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, Halabalaki M, AI-Ahmad A, Hellwig E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Wittmer A, Vach K, Karygianni L. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0207574.
- [18] Lavaee F, Ghapanchi J, Motamedifar M, Sharifzade Javidi M. Experimental evaluation of the effect of zinc salt on inhibition of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry (Shiraz)*, 2018, 19(3): 168–173.
- [19] Fozo EM, Quivey RG Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 929–936.
- [20] Han FS, Han YZ, Liu YX. Construction of *LuxS* gene deletion of *Streptococcus mutans* and evaluation of the acid tolerance of the mutant. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2010, 30(7): 608–612. (in Chinese) 韩福胜, 韩玉植, 刘宇霞. 变异链球菌 *LuxS* 基因缺陷株的建立及其耐酸能力的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(7): 608–612.

Effect of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*

Yaochao Zhang^{*}, Yanping Zuo, Fang Zhou, Chengfang Tang, Linmei Zhang

College of Stomatology, Xi'an Medical University, Xi'an 710075, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] To study the effects of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. [Methods] MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used to analyze the effects of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*; oxygen sensitivity test was used to detect the effects of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside on oxygen sensitivity of *S. mutans*; Realtime PCR was used to detect gene expression level. The cytotoxic of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside was analyzed by using human monocytes. [Results] We found that lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside could significantly inhibit the growth of *S. mutans*, and also suppress the biofilm formation of *S. mutans* in a concentration-dependent manner. And in lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside-treated biofilms, we also found that the mRNA expression levels of *brpA* (transcriptional regulator), *recA* (recombinase A), *nth* (endonuclease III), *luxS* (S-ribosylhomocysteinase), *ffh* (fifty four homologue), *smx* (sulfamethoxazole), *gtfB* (glucosyltransferase-I) and *gtfC* (glucosyltransferase-SI) were all decreased. We further revealed that lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside (50 μg/mL) had no effect on the growth and LDH activity of human monocytes. [Conclusion] Our findings suggested that lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside inhibited the biofilm formation of *S. mutans*, and the decrease of *luxS*, *brpA*, *ffh*, *recA*, *nth*, *smx*, *gtfB* and *gtfC* might contribute to the antibacterial effects of lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside.

Keywords: lariciresinol-4-β-D-glucopyranoside, biofilm, *Streptococcus mutans*, antibacterial

(本文责编: 李磊)

Supported by the Special Scientific Research Plan Project of Shaanxi Provincial Department of Education (18JK0656)

*Corresponding author. E-mail: zhangyc@xiji.edu.cn

Received: 27 November 2019; Revised: 15 January 2020; Published online: 9 March 2020