

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.07.005

· 基础研究 ·

# 黄芩苷对变异链球菌 UA159 体外的抑制作用

吴菊, 王玲, 刘兴容

西南医科大学口腔医学院, 西南医科大学附属口腔医院儿童口腔科, 四川 泸州(646000)

**【摘要】** 目的 探讨黄芩苷对变异链球菌国际标准株 UA159 的体外抑制作用。方法 采用液体倍比稀释法结合酶标仪测 OD<sub>600</sub> 值测定黄芩苷对变异链球菌 UA159 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。利用酶标仪测定不同浓度的黄芩苷药液中变异链球菌 UA159 的 OD<sub>600</sub> 值, 绘制生长曲线; 计算黏附率及黏附抑制率; 用结晶紫定量法测定黄芩苷对变异链球菌 UA159 生物膜形成的影响; 用扫描电镜观察黄芩苷对变异链球菌 UA159 细菌总量的影响。结果 黄芩苷对变异链球菌 UA159 最低抑菌浓度为 12 mg/mL; 随着黄芩苷药液浓度的增加, 变异链球菌 UA159 生长速度缓慢, 并且其黏附率下降, 黏附抑制率增加 ( $P < 0.05$ )。结晶紫定量法结果显示, 与菌液组相比, 0、6、12 h 时加入黄芩苷药液变异链球菌 UA159 生物膜形成量显著降低 ( $P < 0.001$ )。扫描电子显微镜下, 0、6、12 h 时加入黄芩苷后细菌总量均明显下降。结论 黄芩苷能够抑制体外变异链球菌 UA159 的生长繁殖; 同时其对变异链球菌 UA159 的黏附、生物膜形成均有抑制作用。

**【关键词】** 黄芩苷; 天然药物; 变异链球菌 UA159; 龋病; 最低抑菌浓度; 生长曲线; 黏附率; 黏附抑制率; 生物膜形成; 体外研究

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)07-0462-06



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

**【引用著录格式】** 吴菊, 王玲, 刘兴容. 黄芩苷对变异链球菌 UA159 体外的抑制作用[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(7): 462-467. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.07.005.

**Inhibitory effect of baicalin on *Streptococcus mutans* UA159 in vitro** WU Ju, WANG Ling, LIU Xingrong, School of Stomatological, Southwest Medical University, Department of Children's Stomatology, Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Corresponding author: LIU Xingrong, Email: liuxingrong163@163.com, Tel: 86-830-3101243

**【Abstract】 Objective** To investigate the inhibitory effect of baicalin on *Streptococcus mutans* UA159 in vitro. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of baicalin on *Streptococcus mutans* UA159 was determined by the liquid multiple dilution method combined with the OD<sub>600</sub> value measured by microplate. The OD<sub>600</sub> value of *Streptococcus mutans* UA159 in different concentrations of baicalin was measured by an enzyme mapping instrument. A growth curve was drawn, and the adhesion rate and adhesion inhibition rate were calculated. The effect of baicalin on the formation of *Streptococcus mutans* UA159 biofilms was observed by the crystal violet quantitative method and scanning electron microscopy. The effect of baicalin on the total number of *Streptococcus mutans* UA159 bacteria was observed by scanning electron microscopy. **Results** The MIC of baicalin on *Streptococcus mutans* UA159 was 12 mg/mL. With increasing baicalin concentration, the growth rate of *Streptococcus mutans* UA159 was slowed, the adhesion rate of *Streptococcus mutans* UA159 decreased and the adhesion inhibition rate increased ( $P < 0.05$ ). The results of crystal violet quantitative method showed that compared with the bacterial control group, the biofilm formation of *Streptococcus mutans* UA159 was significantly reduced after adding baicalin at 0 h, 6 h and 12 h ( $P < 0.001$ ). Under a scanning electron microscope, the total number of bacteria decreased significantly after adding baicalin at 0 h, 6 h and 12 h. **Conclusion** Baicalin can inhibit the growth and reproduction of *Streptococcus mutans* UA159 in vitro as well as the adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* UA159.

**【收稿日期】** 2020-10-26; **【修回日期】** 2020-12-22

**【基金项目】** 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研项目(14JC0049-LY53)

**【作者简介】** 吴菊, 硕士研究生, Email: 302871518@qq.com

**【通信作者】** 刘兴容, 教授, Email: liuxingrong163@163.com, Tel: 86-830-3101243

**【Key words】** baicalin; natural medicine; *Streptococcus mutans* UA159; caries; minimum inhibitory concentration; growth curve; adhesion rate; adhesion inhibition rate; biofilm formation; *in vitro* study

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(7): 462-467.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Joint Scientific Research Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology Luzhou Municipal People's Government and Luzhou Medical College (No. 14JC0049-LY53).

龋病是常见的口腔细菌性疾病之一,不仅会影响患者咀嚼功能,还会影响患者言语、面部表情,甚至会影响患者的心理健康<sup>[1-2]</sup>。研究表明,变异链球菌可通过黏附、产酸和耐酸作用破坏牙体组织而形成龋坏。黄芩是一种具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗菌等多种生物活性的中药,可用于治疗呼吸道感染、肺炎、结肠炎、肝炎和过敏性疾病<sup>[3]</sup>。黄芩苷(baicalin)是从黄芩的干燥根中提取的一种黄酮类化合物,是黄芩的主要活性成分,仅在黄芩的根部黄芩苷的含量就可以达10.11%<sup>[4]</sup>。研究表明,黄芩能够抑制痤疮丙酸杆菌引起的白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和IL-8水平的上调<sup>[5]</sup>;黄芩苷能够抑制铜绿假单胞菌的生物膜形成<sup>[6]</sup>。本文旨在探讨黄芩苷对变异链球菌的抑菌作用;测定黄芩苷在体外环境中对变异链球菌 UA159 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC);观察不同浓度黄芩苷对变异链球菌 UA159 生长、黏附能力及生物膜形成的影响,为其在龋病防治中的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株与试剂

变异链球菌国际标准株 UA159(以下简称 UA159)由四川大学华西口腔医学院国家重点实验室提供。BHI 琼脂培养基、BHI 液体培养基、磷酸盐缓冲液、黄芩苷、二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司,中国)、50%戊二醛(成都市科隆化学品有限公司,中国)、结晶紫染色液(上海碧云天生物技术有限公司,中国)、一次性无菌接种环(Bilogix Group, 美国)、Millex-GP 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(Millipore 公司,美国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 液体倍比稀释法测定 UA159 的 MIC 值** 取 10 支试管,编号 1~10。1、2、8 号试管中加入 1 mL 黄芩苷药液(浓度为 48 mg/mL),2~7、9、10 试管中加入 1 mL BHI 液体培养基,1~7 号管内按二倍梯度

稀释,黄芩苷药液浓度依次为 48、24、12、6、3、1.5、0.75 mg/mL;第 8 管为药液对照组,药液浓度为 48 mg/mL;第 9 管为溶剂对照组,药液浓度为 0 mg/mL;第 10 管为菌液对照组,药液浓度 0 mg/mL。取冻存变异链球菌 UA159 菌株,复苏传代,厌氧培养 24 h;经镜检确定为纯培养后,取单个菌落接种于 BHI 液体培养基中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、厌氧培养 18 h;离心,无菌 PBS 漂洗 3 次;离心并用 BHI 液体培养基稀释重悬,调整菌液吸光度为  $\text{OD}_{600} = 1.0$ ;BHI 液体培养基稀释 UA159 菌悬液 100 倍后,加入到 1~7 号、9 号及 10 号试管中;8 号试管中加入等体积的 BHI 液体培养基。酶标仪测 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧箱培养 0、24 h 后各试管内 UA159 的  $\text{OD}_{600}$  值,计算 24 h 后的 OD 增长值,即  $\Delta\text{OD}_{600}$  值。每个浓度取样 3 次,记录数值取平均值。

**1.2.2 UA159 生长曲线测定** 取 5 支试管,编号 1~5。BHI 液体培养基分别稀释黄芩苷药物至 MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 浓度,分别 0.5 mL 加入 1~4 号试管中;5 号试管为加入 BHI 液体培养基 0.5 mL 作为菌液对照组;5 支试管中均加入 0.5 mL BHI 液体培养基稀释 100 倍后的 UA159 菌悬液。酶标仪测 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧箱培养 0、4、8、12、16、24 h 后各试管内 UA159 的  $\text{OD}_{600}$  值,实验重复 3 次,计算  $\text{OD}_{600}$  均值,绘制 UA159 的生长曲线。

**1.2.3 不同浓度的黄芩苷对 UA159 黏附能力影响** 取 5 支试管,编号 1~5;将 1%蔗糖 BHI 液体培养基分别稀释黄芩苷药物至 MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 浓度,分别加入 1.5 mL 于 1~4 号试管,5 号试管加入 1%蔗糖 BHI 液体培养基 1.5 mL。5 支试管中各加入 1.5 mL 稀释 100 倍后的菌悬液,将 5 支试管倾斜 30 $^{\circ}$ ,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧箱孵育 18 h 后取出。孵育 18 h 后,试管内液体均倒入第二批相应编号的试管中,原试管中各加入 3 mL PBS 液。轻轻洗涤震荡,将洗涤液移至第三批相应编号的试管中,原试管中再次加入 3 mL PBS 液,刮下原试管壁上的全部细菌。将第二、三批试管离心,弃上清液,再加入 3 mL PBS 液。酶标仪测定三批试管中

UA159的OD<sub>600</sub>值,取3次。第一、二、三批试管内OD<sub>600</sub>值分别对应为X、Y、Z值,计算细菌的黏附率及黏附抑制率;黏附率 =  $X/(X+Y+Z) \times 100\%$ ;黏附抑制率 =  $(\text{菌液组黏附率} - \text{实验组黏附率}) / \text{菌液组黏附率} \times 100\%$ 。

**1.2.4 黄芩苷对UA159生物膜形成量的影响** 取96孔板,1~5号孔中分别加入100 μL BHI液体培养基稀释100倍后的UA159菌悬液,每孔设置3个复孔。厌氧培养24 h,在第0 h、6 h、12 h,分别在1~3号及复孔中加入100 μL含20 mg/mL的黄芩苷药液的BHI液体培养基。设置4号溶剂对照组和5号菌液对照组。24 h后取出孔板,吸弃培养液,无菌PBS缓冲液漂洗3次,干燥,甲醛固定;洗去甲醛,每孔加入1%结晶紫染色液200 μL,静置5 min吸出,PBS缓冲液漂洗3次,室温干燥。每孔加入33%冰乙酸溶液200 μL,37 °C恒温培养箱中作用30 min后,酶标仪测定OD<sub>600</sub>值以评估生物膜形成的量。

**1.2.5 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察黄芩苷对UA159细菌总量的影响** 重复1.2.4方法稀释UA159菌液,取2个一次性无菌6孔板,其中10个孔中均置入22 mm × 22 mm无菌盖玻片,加入菌液1 mL,分5组,每组2孔,厌氧培养24 h,在第0、6、12 h这三个时间点,分别在1、2、3组的每个孔中加入1 mL 20 mg/mL的黄芩苷药液,使得最终黄芩苷药液浓度为10 mg/mL。设置溶剂对照组和菌液对照组。取出6孔板,吸干菌液,无菌PBS溶液漂洗,吸弃;加入2 mL的2.5%戊二醛溶液,加盖放入4 °C冰箱中固定4 h;吸弃孔内戊二醛溶液,无菌PBS溶液漂洗,PBS缓冲液漂洗2次;依次用50%、70%、80%、90%酒精梯度脱水,无水乙醇脱水2次,室温干燥。每组选取1枚化盖玻片CO<sub>2</sub>临界点干燥粘台,喷金。SEM下观察,拍照存图。

### 1.3 统计学分析

采取SPSS Statistics20.0进行分析,定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析;Leven检验方差齐性,方差齐性采用LSD法分析;方差不齐采用Dunnett's法分析; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义

## 2 结果

### 2.1 黄芩苷对UA159的MIC值

试管1、2号表现为清亮无浑浊沉淀生长的淡黄色液体,而试管3~7号、9号与10号表现为淡黄

色浑浊液体或有沉淀。 $\Delta OD_{600}$ 值结果见表1,经过单因素方差分析,各组间差异有统计学意义( $F = 2435.346, P < 0.05$ ),根据结果所示,结合以肉眼观察试管内液体清亮无浑浊或沉淀的最低药物浓度为黄芩苷的MIC,测得黄芩苷对变异链球菌UA159的MIC值为12 mg/mL。

表1 变异链球菌UA159在不同黄芩苷浓度下的 $\Delta OD_{600}$ 值  
Table 1  $\Delta OD_{600}$  value of *Streptococcus mutans* UA159 at different baicalin concentrations  $\bar{x} \pm s, n = 3$

Tube number	Baicalin concentration (mg/mL)	$\Delta OD_{600}$ 值	P
1	24	0.046 ± 0.007	< 0.001
2	12	0.094 ± 0.001	< 0.001
3	6	0.182 ± 0.004	< 0.001
4	3	0.265 ± 0.002	< 0.001
5	1.5	0.377 ± 0.003	0.406
6	0.75	0.377 ± 0.005	0.544
7	0.375	0.378 ± 0.008	0.595
8	24	0.020 ± 0.005	< 0.001
9	0	0.377 ± 0.007	0.496
10	0	0.380 ± 0.005	-

P value: compared with tube 10 (bacteria control group)

### 2.2 生长曲线测定

由2.1结果已知MIC为黄芩苷对变异链球菌UA159的MIC值为12 mg/mL,则设置MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC浓度分别为12、6、3、1.5 mg/mL。变异链球菌UA159的生长速度随着黄芩苷药液浓度的增加而变慢。在0~12 h内菌液组增长迅速,后速度变缓,进入稳定期;1.5 mg/mL药液组与菌液对照组相比在0 h、4 h时OD<sub>600</sub>值较低,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),12、6、3 mg/mL三组与菌液对照组(0 mg/mL)各个时间点相比,OD<sub>600</sub>值均较低,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),不同黄芩苷浓度组组间相互比较差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表2、图1。

### 2.3 黄芩苷对变异链球菌UA159黏附的影响

变异链球菌UA159在37 °C厌氧培养18 h后黏附率为42.33%;随着黄芩苷药液组浓度的增加,变异链球菌UA159黏附率下降;经单因素方差分析,各组间差异有统计学意义( $F = 760.401, P < 0.05$ );各浓度组与菌液对照组(0 mg/mL)相比,其差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。根据黏附率计算得出各组的黏附抑制率显示:随着黄芩苷药液浓度的增加黏附抑制率在增加,各组间差异有统计学意义( $F = 667.282, P < 0.05$ )。且各组间两两比较,其



表2 变异链球菌 UA159 在不同时间点不同黄芩苷浓度下的  $\Delta OD_{600}$  值

Table 2  $\Delta OD_{600}$  value of *Streptococcus mutans* UA159 at different concentrations of baicalin at different time points  $\bar{x} \pm s, n = 3$

Time(h)	Baicalin concentration					F	P			
	12 mg/mL	6 mg/mL	3 mg/mL	1.5 mg/mL	0 mg/mL		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
4	0.123 ± 0.002	0.152 ± 0.002	0.184 ± 0.004	0.192 ± 0.003	0.211 ± 0.004	349.182	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
8	0.174 ± 0.005	0.236 ± 0.008	0.311 ± 0.005	0.375 ± 0.003	0.380 ± 0.002	895.601	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.246
12	0.211 ± 0.005	0.315 ± 0.009	0.411 ± 0.003	0.458 ± 0.004	0.466 ± 0.003	1 180.943	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.103
24	0.277 ± 0.003	0.327 ± 0.003	0.452 ± 0.005	0.466 ± 0.003	0.473 ± 0.002	2 197.682	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.068

P<sub>1</sub>: 12 mg/mL group vs. 0 mg/mL group; P<sub>2</sub>: 6 mg/mL group vs. 0 mg/mL group; P<sub>3</sub>: 3 mg/mL group vs. 0 mg/mL group; P<sub>4</sub>: 1.5 mg/mL group vs. 0 mg/mL group

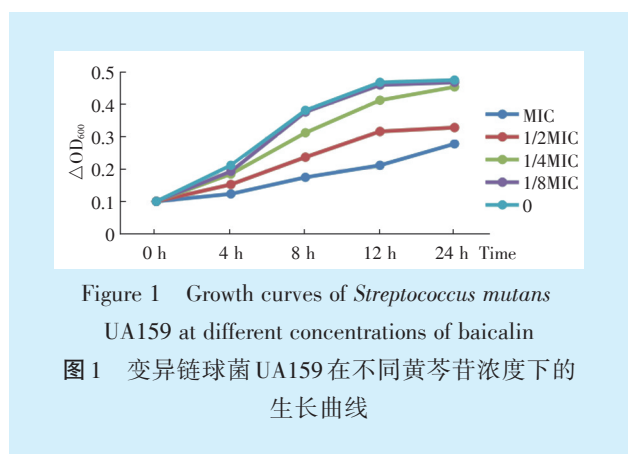


Figure 1 Growth curves of *Streptococcus mutans* UA159 at different concentrations of baicalin

图1 变异链球菌 UA159 在不同黄芩苷浓度下的生长曲线

差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表3 不同黄芩苷浓度对变异链球菌 UA159 黏附的影响

Table 3 Effects of different concentrations of baicalin on adhesion of *Streptococcus mutans* UA159  $\bar{x} \pm s, n = 3$

Baicalin concentration	Adhesion rate (%)	Adhesion inhibition rate (%)
12 mg/mL	28.00 ± 0.36*	33.83 ± 0.92 <sup>△</sup>
6 mg/mL	31.13 ± 0.47*	25.77 ± 2.18 <sup>△</sup>
3 mg/mL	33.06 ± 0.20*	22.18 ± 0.69 <sup>△</sup>
1.5 mg/mL	35.47 ± 0.40*	16.18 ± 0.71 <sup>△</sup>
0 mg/mL	42.32 ± 0.45	0

\*: compared with 0 mg/mL group,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ : group comparison,  $P < 0.05$

#### 2.4 黄芩苷对变异链球菌 UA159 的生物膜形成的影响

黄芩苷对变异链球菌 UA159 生物膜形成量的影响结果见表 4, 经单因素方差分析, 各组间差异有统计学意义 ( $F = 958.613, P < 0.05$ )。与菌液组相比, 0、6、12 h 时加入黄芩苷药液干预变异链球菌生物膜形成的差异是有统计学意义的 ( $P < 0.001$ ), 而溶剂组细菌生物膜形成的差异无统计学意义 ( $P = 0.304$ )。

表4 黄芩苷对变异链球菌 UA159 的生物膜形成量的影响

Table 4 Effects of baicalin on biofilm formation of

*Streptococcus mutans* UA159  $\bar{x} \pm s, n = 3$

Group	OD <sub>600</sub>	P
0 h	0.132 ± 0.003	< 0.000
6 h	0.247 ± 0.007	< 0.000
12 h	0.288 ± 0.006	< 0.000
Solvent control	0.376 ± 0.004	0.304
Bacteria control	0.381 ± 0.007	-

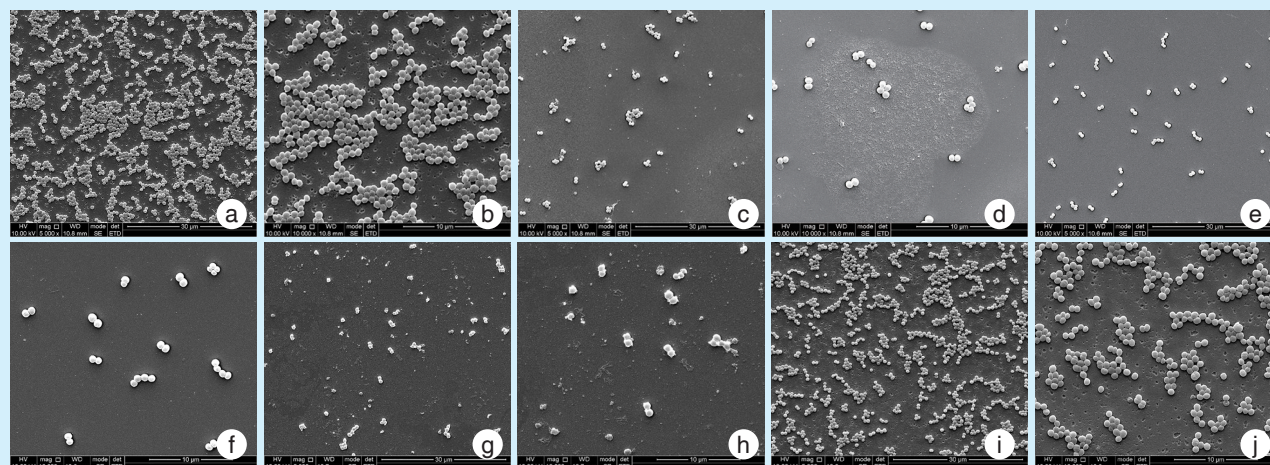
P value: compared with bacteria control group

#### 2.5 SEM 观察黄芩苷对变异链球菌 UA159 细菌总量的影响

SEM 下观察菌株背景为灰黑色, 细菌菌体为亮白色, 圆形。变异链球菌 UA159 培养 24 h 后生长良好 (图 2a、2b)。0 h 加入黄芩苷后 UA159 菌体均基本以成对状 (图 2c、2d); 6 h 加入黄芩苷后细菌总量明显下降 (图 2e、2f); 12 h 时加入黄芩苷后细菌总量明显下降 (图 2g、2h)。溶剂对照组 (图 2i、2j) 与菌液对照组相比, 无明显差异。

### 3 讨论

牙菌斑的形成与发育需要多种细菌的参与, 变异链球菌血清型 c、e、f 是已知的致龋菌<sup>[8-9]</sup>。变异链球菌通过使牙体硬组织脱矿导致龋齿形成<sup>[10]</sup>。目前临床上常用的防龋方法有氟化物防龋、氯己定防龋等。研究表明, 氟化物虽然对变异链球菌生物膜具有抗酸作用, 但短暂的氟化物处理不能维持对生物膜中的变形链球菌的抗酸活性, 生物膜的损害可以随着时间的推移而恢复<sup>[11]</sup>。氟化物的滥用易导致耐氟菌株的出现, 过量使用会导致人体氟中毒, 出现氟骨症、氟斑牙等。天然药物具有毒副作用小、不易造成菌群失调等优点, 已有研究发现, 黄柏、肉桂、丁香、金针菇提取物等天然药物对变异链球菌都有抑制作



a-b: bacteria control group, UA159 grew well; a: SEM ( $\times 5\ 000$ ); b: SEM ( $\times 10\ 000$ ); c-d: added 10 mg/mL baicalin at 0 h, UA159 grew in pairs; c: SEM ( $\times 5\ 000$ ); d: SEM ( $\times 10\ 000$ ); e-f: added 10 mg/ml baicalin at 6 h, the total number of UA159 decreased significantly; e: SEM ( $\times 5\ 000$ ); f: SEM ( $\times 10\ 000$ ); g-h: added 10 mg/mL baicalin at 12 h, the total number of UA159 decreased significantly; g: SEM ( $\times 5\ 000$ ); h: SEM ( $\times 10\ 000$ ); i-j: in the solvent control group, there were no significant differences compared with the bacteria control group; i: SEM ( $\times 5\ 000$ ); j: SEM ( $\times 10\ 000$ ); SEM: scanning electron microscope.

Figure 2 Effects of baicalin on the total number of *Streptococcus mutans* UA159 bacteria was observed under SEM

图2 扫描电镜下观察黄芩苷对变异链球菌UA159细菌总量的影响

用<sup>[12-14]</sup>。黄芩苷作为一种天然的抑菌药物,目前国内外关于黄芩苷与变异链球菌致龋性研究比较少见。

### 3.1 黄芩苷对变异链球菌生长的影响

本实验采用液体二倍稀释法结合酶标仪测定天然药物黄芩苷对变异链球菌生长的作用,结果显示黄芩苷对变异链球菌 UA159 的 MIC 值为 12 mg/mL。在生长实验中,把变异链球菌 UA159 添加到质量浓度为 12、6、3、1.5 mg/mL 的黄芩苷及无药液的 BHI 培养基内,从不同时间点的 OD<sub>600</sub> 值看出,加入黄芩苷的变异链球菌 UA159 与标准变异链球菌 UA159 生长趋势上基本一致,但菌液浓度均低于标准变异链球菌 UA159 组,推测其原因可能是黄芩苷可能并不影响变异链球菌 UA159 生长的基本趋势,但会影响变异链球菌 UA159 增殖速度。

### 3.2 黄芩苷对变异链球菌黏附的影响

黏附是细菌在宿主内定居的第一步,变异链球菌对牙面的黏附是其定植、致龋的基础。变形链球菌菌株产生三种葡糖基转移酶 (glucosyl transferase, GTF), 包括 GTF-B、GTF-C 和 GTF-D, 它们利用蔗糖作为底物来合成葡聚糖; 变异链球菌还具有多种高亲和力表面粘附素, 即使在没有蔗糖的情况下也能够定植<sup>[15]</sup>。黏附素在变异链球菌与基

质的黏附中发挥重要作用,黏附素包含葡糖基转移酶、葡聚糖结合蛋白、变异链球菌表面蛋白 P1 等。本实验结果显示,变异链球菌 UA159 在 37 °C 厌氧培养 18 h 后黏附率为 42.33%; 随着黄芩苷药液浓度的增加,变异链球菌 UA159 黏附率下降,对细菌的黏附抑制率在增加;表明黄芩苷具有抑制变异链球菌黏附的作用。黄芩苷抑制变异链球菌黏附的具体抑制机制尚不清楚,可能与黏附相关因子或者黏附相关基因有关,有待进一步研究。

### 3.3 黄芩苷对变异链球菌生物膜形成及细菌总量的影响

口腔内牙菌斑形成过程比较复杂,以下三个阶段:获得性膜形成阶段、细菌附着阶段、菌斑成熟阶段,细菌表面的受体可在获得性膜形成后,与之结合,可共同抵抗有渗透作用的药物,同时还可加强其他微生物对牙釉质的黏附作用<sup>[16]</sup>。变异链球菌分泌的胞外多糖,容易与结晶紫结合,胞外多糖与结晶紫的结合物在 600 nm 波长下有最大吸收,因此,为了反映生物膜的生成量,本实验采用酶标仪在 600 nm 波长下测定 OD 值,OD 值越小表示生物膜的生成量越小,即药物对生物膜的抑制作用越强。本实验发现:在 0、6、12 h 时加入黄芩苷药液均可影响变异链球菌 UA159 生物膜形成的量,

DMSO 溶液不会影响细菌生物膜形成的量,说明黄芩苷对变异链球菌 UA159 生物膜形成有很好的抑制效果。

电子显微镜显著优于光学显微镜的一大特点是它的高分辨率,目前超高分辨率扫描电镜分辨率高达 0.4 nm。本实验通过 SEM 观察到 10 mg/mL 的黄芩苷在 0、6、12 h 时加入均可影响 UA159 在体外盖玻片上形成的细菌总量的密度,表明在变异链球菌 UA159 形成的不同时期加入黄芩苷均使细菌总量显著减少。

#### 4 小 结

本实验通过天然药物黄芩苷对致龋菌变异链球菌在体外环境中进行研究,得出以下结论:①黄芩苷对变异链球菌 UA159 的 MIC 值为 12 mg/mL;②黄芩苷并不影响变异链球菌基本的生长趋势,但会降低其生长增殖的速度;③黄芩苷可以抑制变异链球菌的黏附,但并不能完全使变异链球菌丧失黏附能力;④黄芩苷可以减缓变异链球菌细菌生物膜的形成速度,但不能完全阻断细菌生物膜的形成;⑤黄芩苷对变异链球菌形成的不同时期均有抑制作用。

**【Author contributions】** Wu J performed the experiments and wrote the article. Wang L collected the data. Liu XR designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

#### 参考文献

- [1] Mathur VP, Dhillon JK. Dental caries: a disease which needs attention[J]. Indian J Pediatr, 2018, 85(3): 202-206. doi: 10.1007/s12098-017-2381-6.
- [2] Bernabé E, Marcenes W. Can minimal intervention dentistry help in tackling the global burden of untreated dental caries?[J]. Br Dent J, 2020, 229(7): 487-491. doi: 10.1038/s41415-020-2155-9.
- [3] Liao H, Ye J, Gao L, et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110917. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110917.
- [4] Zhang S, Hu B, Xu J, et al. Baicalin suppress growth and virulence-related factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*[J]. Microb Pathog, 2020, 139: 103899. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103899.
- [5] Zhu X, Mao Y, Guo M, et al. Enhancement of anti-acne effect of *Scutellaria baicalensis* extract by fermentation with symbiotic fungus *Penicillium decumbens*[J]. J Biosci Bioeng, 2020, 130(5): 457-463. doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.06.008.
- [6] Luo J, Dong BY, Wang K, et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model[J]. PLoS one, 2017, 12(4): e0176883. doi: 10.1371/journal.pone.0176883.
- [7] Zhao Q, Chen XY, Martin C. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants[J]. Sci Bull (Beijing), 2016, 61(18): 1391-1398. doi: 10.1007/s11434-016-1136-5.
- [8] Saltos RN, Seoane PR, Aguilera GA, et al. Molecular and serological typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from young Galician population: relationship with the oral health status[J]. Int Microbiol, 2020, 23(4): 589-596. doi: 10.1007/s10123-020-00132-2.
- [9] Rincón-Rodríguez RJ, Parada-Sánchez MT, Bedoya-Correa CM, et al. Genetic diversity of *Streptococcus mutans* serotype c isolated from white spot and cavitated caries lesions from schoolchildren [J]. Arch Oral Biol, 2019, 100: 33-41. doi: 10.1016/j.archoral-bio.2019.02.003.
- [10] De A, Jorgensen A, Beatty WL, et al. Deficiency of MecA in *Streptococcus mutans* causes major defects in cell envelope biogenesis, cell division, and biofilm formation[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2130. doi: 10.3389/fmicb.2018.02130.
- [11] Dang MH, Jung JE, Lee DW, et al. Recovery of acid production in *Streptococcus mutans* biofilms after short-term fluoride treatment [J]. Caries Res, 2016, 50(4): 363-371. doi: 10.1159/000446408.
- [12] Tsujii T, Kawada-Matsuo M, Migita H, et al. Antibacterial activity of phellodendron bark against *Streptococcus mutans*[J]. Microbiol Immunol, 2020, 64(6): 424-434. doi: 10.1111/1348-0421.12787.
- [13] Cui C, Xu H, Yang H, et al. Antibacterial activity of fruiting body extracts from culinary-medicinal winter mushroom, *flammulina velutipes* (agaricomycetes) against oral pathogen *Streptococcus mutans*[J]. Int J Med Mushrooms, 2020, 22(2): 115-124. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.
- [14] Elgamaly H, Safy R, Makharitha R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an *in-vitro* study[J]. Open Access Maced J Med Sci, 2019, 7(14): 2328 - 2334. doi: 10.3889/oam-jms.2019.653.
- [15] Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, et al. The biology of *Streptococcus mutans*[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(1): 10. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
- [16] 郭馨蔚, 赵洪岩, 杨瑶瑶, 等. 牙周炎菌群失调研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(11): 739-744. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.11.010.

(编辑 周春华)



官网



公众号